



Instituto Politécnico de Tomar

Escola Superior de Tecnologia de Tomar

Vera Patrícia Miguel Duarte Luís

# Otimização de Processos Fermentativos a partir de Citrinos

Relatório de Estágio

Orientado por:

Doutor Valentim Nunes, IPT

Eng.º Marco Alves, Inov'Linea

Relatório de Estágio apresentado ao Instituto  
Politécnico de Tomar para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de  
Mestre em Tecnologia Química







## RESUMO

O presente trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de um processo fermentativo para o desenvolvimento de um produto alimentar, nomeadamente o vinagre de laranja e mel.

Este trabalho tem como base o estágio previsto no plano curricular do curso de Mestrado em Tecnologia Química, ministrado pelo Instituto Politécnico de Tomar, realizado no laboratório INOV'LINEA (Centro de Transferência de Tecnologia Alimentar), que é parte integrante da TAGUSVALLEY – Associação para a promoção e Desenvolvimento do Tecnopolo do vale do Tejo, localizado em Alferrarede, concelho de Abrantes.

O estágio decorreu entre os meses de fevereiro e julho de 2017 e teve como tema “Otimização de Processos Fermentativos a partir de Citrinos”, com base numa proposta exterior para adaptação do processo às condições existentes na empresa, com a utilização de matéria-prima produzida no local e em condições menos favoráveis, ou seja a temperaturas mais baixas, que são as condições existentes no local requerente do novo produto.

Inicialmente foram feitos ensaios exploratórios quer da fermentação alcoólica quer da acética para compreender melhor o desenvolvimento de cada uma delas e detetar possíveis obstáculos que pudessem surgir devido à matéria-prima utilizada ou às condições em que se pretendia realizar.

Realizaram-se mais ensaios para a fermentação alcoólica e para a fermentação acética, nos quais foram alterados três fatores: tipo de levedura, °Brix e temperatura de modo a avaliar como cada um deles interferia com a fermentação.

Durante as fermentações alcoólicas foi acompanhada a evolução do °Brix, para verificar quando a fermentação terminava. Nas fermentações acéticas foi medido o pH diariamente e acompanhado também a evolução da percentagem de acidez.

No final verificou-se que era possível trabalhar em condições menos favoráveis, as fermentações alcoólicas ocorreram normalmente mesmo a temperaturas mais baixas com rendimentos finais de cerca de 85%, o mesmo se verificou com as fermentações acéticas, tendo sido obtido vinagre de laranja e mel com as características desejadas.

**Palavras-chave:** Laranja; Mel; Vinagre; Fermentação alcoólica; Fermentação acética



## ABSTRACT

The presente work has as it's main goal the development of a fermentative process to produce a food product, in particular, the orange and honey vinegar.

This work is based on the curricular plan of the master's degree in chemical technology, taught by the Polytechnic Institute of Tomar, performed in the lab INOV'LINEA (food technology transference center), that belongs to TAGUSVALLEY – promotion and development partnership of Tecnopolo of Valo do Tejo, in Alferrarede, Abrantes.

The stage took place between February and July 2017 and had as subject 'Optimization of fermentative processes from citrus fruits', based on an external proposal to adapt the process to the company conditions, using raw materials from the local in less propitious conditions like lower temperature, which are the conditions in the local where the product is going to be needed.

Initially were made exploratory tests for both alcoholic and acetic fermentation to better understand the increase of each one of them and detect possible barriers that could appear duo to the raw material or the conditions where it would be performed.

Further tests were carried on the alcoholic fermentations and the acetic fermentations, in which three factors were changed: type of leaven, °Brix and temperature, to see how each one of them would interfere with the fermentation.

During the alcoholic fermentation we followed the °Brix's evolution to verify the fermentation ending. In the acetic fermentation the pH was measured daily, followed by the acidity percentage evolution.

In the end it was confirmed the success of alcoholic fermentation, even in less favorable conditions like low temperature, with final income of 85%. The same occurred with the acetic fermentation, allowing the production of orange e honey vinegar with the desired characteristics.

Keywords: Orange; Honey; Vinegar; Alcoholic fermentation; Acetic fermentation





## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, que sempre me apoiaram e que sem eles não teria sido possível chegar até aqui.

Ao Doutor Valentim Nunes pela disponibilidade e orientação prestada durante o estágio e realização deste trabalho.

À Doutora Dina Mateus por tornar possível a concretização deste estágio, ao Instituto Politécnico de Tomar, pela oportunidade de poder estagiar fora das instalações, assim como a todos os docentes destas instalações que acompanharam o meu percurso académico e contribuíram com os ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao INOV'LINEA, em especial ao Engenheiro Marco Alves, por todo o apoio e ajuda disponibilizada durante e após o tempo de estágio pela excelente orientação simpatia e transmissão de conhecimentos durante a realização do estágio, assim como a todos os restantes elementos por me terem recebido.

Por fim, agradeço também a todos os meus familiares e amigos por todo o apoio, paciência e incentivo em mais uma etapa da minha vida.

A todos o meu sincero Obrigado!



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XV
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1- Enquadramento do Tema.....	1
1.2- INOV' LINEA.....	2
1.3- Fundamentos Teóricos.....	3
1.3.1- O Vinagre.....	3
1.3.2- Legislação e Qualidade do Vinagre .....	4
1.3- Fermentação.....	7
1.3.1- Fermentação Alcoólica .....	7
1.3.2- Fermentação Acética.....	13
1.3.4- Matéria-prima .....	19
2- MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
2.1- Preparação da Matéria-prima.....	24
2.2- Fermentação Alcoólica .....	26
2.2.1- Ensaio Exploratórios .....	27
2.2.2- Ensaio Realizados.....	28
2.3- Fermentação Acética .....	31
2.3.1- Ensaio Exploratórios .....	33
2.3.2- Ensaio Realizados.....	34
2.4- Métodos Analíticos.....	34
2.4.1- Medição do pH.....	35
2.4.2- Medição do °Brix .....	35
2.4.3- Medição do Teor Alcoólico .....	36
2.4.4- Acidez Total.....	39
2.4.4.1- Exemplo de cálculo para a acidez total.....	39
2.5- Cálculos de Rendimento.....	40
2.5.1- Exemplo de cálculo para a fermentação alcoólica .....	41
2.5.2- Exemplo de cálculo para a fermentação acética .....	44
3- APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS .....	47
3.1- Ensaio Exploratórios .....	47

3.1.1- Fermentações Alcoólicas .....	47
3.1.2- Fermentações Acéticas .....	51
3.2- Ensaio Realizados .....	54
3.2.1- Fermentações Alcoólicas .....	54
3.2.2- Fermentações Acéticas .....	65
4- DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	71
4.1- Ensaio Exploratório.....	71
4.1.1- Fermentações Alcoólicas .....	71
4.1.2- Fermentações Acéticas .....	72
4.2- Ensaio Realizados .....	74
4.2.1- Fermentações Alcoólicas .....	74
4.2.2- Fermentações Acéticas .....	76
5- CONCLUSÃO .....	79
6- REFERÊNCIAS.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: INOV'LINEA; .....	2
Figura 2 - Esquema de processo de fermentação .....	7
Figura 3 - Esquema Fermentação Alcoólica.....	8
Figura 4: Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
Figura 5: “Mãe do vinagre” retirada da barrica da fermentação acética 4.2, no final da fermentação .....	16
Figura 6: Processo tradicional de acetificação .....	17
Figura 7: Diagrama de blocos utilizado para o processo em desenvolvimento.....	23
Figura 8: Cuba de lavagem utilizada .....	24
Figura 9: Máquina de sumos utilizada.....	25
Figura 10: Depósitos de plástico utilizados na fermentação alcoólica .....	27
Figura 11: Barricas de madeira utilizadas na fermentação acética.....	31
Figura 12: Produto final, vinagre depois de embalado .....	33
Figura 13: Medidor de pH utilizado .....	35
Figura 14: Refratómetro utilizado .....	36
Figura 15: VinoCalc – ferramenta online para determinação do teor alcoólico residual ....	37
Figura 16: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 1.....	48
Figura 17: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 2.....	49
Figura 18: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica mel.....	50
Figura 19: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 1 .....	52
Figura 20: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 2 (Mel).....	54
Figura 21: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 3.1.....	55
Figura 22: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente á fermentação alcoólica 3.2.....	56

Figura 23: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 4.1 .....	58
Figura 24: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 4.2 .....	59
Figura 25: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 5.1 .....	60
Figura 26: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 5.2 .....	61
Figura 27: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 6.1 .....	63
Figura 28: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 6.2 .....	64
Figura 29: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 3.1.....	66
Figura 30: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 3.2.....	68
Figura 31: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 4.2.....	70

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da fermentação alcoólica .....	29
Tabela 2: Dados retirados da fermentação alcoólica 2 .....	42
Tabela 3: Dados retirados da fermentação acética 1 .....	44
Tabela 4: Dados referentes à fermentação alcoólica 1 .....	47
Tabela 5: Dados referentes à fermentação alcoólica 1 .....	48
Tabela 6: Dados referentes à fermentação alcoólica mel .....	49
Tabela 7: Dados referentes à fermentação acética 1 .....	51
Tabela 8: Dados referentes à fermentação acética 2 (Mel) .....	53
Tabela 9: Dados referentes à fermentação alcoólica 3.1 .....	55
Tabela 10: Dados referentes à fermentação alcoólica 3.2 .....	56
Tabela 11: Dados referentes à fermentação alcoólica 4.1 .....	57
Tabela 12: Dados referentes à fermentação alcoólica 4.2 .....	58
Tabela 13: Dados referentes à fermentação alcoólica 5.1 .....	60
Tabela 14: Dados referentes à fermentação alcoólica 5.2 .....	61
Tabela 15: Dados referentes à fermentação alcoólica 6.1 .....	62
Tabela 16: Dados referentes à fermentação alcoólica 6.2 .....	63
Tabela 17: Dados referentes à fermentação acética 3.1 .....	65
Tabela 18: Dados referentes à fermentação acética 3.2 .....	67
Tabela 19: Dados referentes à fermentação acética 4.2 .....	69
Tabela 20: Síntese dos resultados das fermentações alcoólicas referentes aos ensaios exploratórios .....	71
Tabela 21: Síntese dos resultados das fermentações acéticas referentes aos ensaios exploratórios .....	72
Tabela 22: Síntese dos resultados das fermentações alcoólicas referentes aos ensaios realizados .....	74
Tabela 23: Síntese dos resultados das fermentações acéticas referentes aos ensaios realizados .....	77





# 1- INTRODUÇÃO

O estágio realizado no âmbito do trabalho final de Mestrado de Tecnologia Química decorreu no INOV'LINEA (Centro de Transferência de tecnologia Alimentar) representado na figura 1. O tema desenvolvido “Otimização de Processos Fermentativos a partir de Citrinos” teve como base um projeto para uma empresa exterior.

O que se pretendeu, foi desenvolver um novo produto, vinagre de laranja e mel, a partir de uma determinada variedade de laranja a “Pala”, em condições menos favoráveis, isto é, adaptadas às condições que o possível produtor tem.

O INOV'LINEA é parte integrante da Tagusvalley – Associação para a Promoção e Desenvolvimento do Tecnopolo do Vale do Tejo, localizada na zona industrial de Alferrarede, Abrantes.

## 1.1- Enquadramento do Tema

O trabalho realizado durante o estágio, teve como principal objetivo o estudo de um processo fermentativo para o desenvolvimento de um produto alimentar, nomeadamente o vinagre de laranja e mel. Foram realizadas várias fermentações alcoólicas e acéticas, tendo como matéria-prima a laranja e o mel, como já foi referido.

Este trabalho teve como base um pedido de uma empresa exterior, que por sua vez pretende saber qual o melhor processo, para ela própria poder produzir e comercializar o produto em questão. Outro grande objetivo passava por desenvolver o processo tendo em conta as características pretendidas para o produto final. E também adaptar o processo às condições existentes na empresa requerente, dado que não podem operar dentro das condições ótimas, mais especificamente, as condições de temperatura ideais ao processo.

Para cumprir os objetivos, começou por se implementar o processo com condições de desenvolvimento muito próximas às condições ótimas, para uma melhor perceção e compreensão das reações em questão.

Nas primeiras fermentações alcoólicas a fonte de açúcar utilizada foi a sacarose, só depois se passou para a utilização do mel, para avaliar se haviam grandes diferenças entre ambas. Nestas fermentações iniciais a levedura utilizada foi a *Saccharomyces bayanus*, também com o intuito de avaliar o seu desempenho.

Para a terceira fermentação alcoólica o mel já foi utilizado como fonte de sacarose, mantendo a levedura e a temperatura de fermentação. As fermentações alcoólicas ocorreram num depósito de plástico em estufa climatizada.

Realizaram-se duas fermentações acéticas, em simultâneo, com os mostos resultantes das fermentações alcoólicas anteriores, sendo utilizado como inóculo o vinagre de vinho não pasteurizado. As fermentações decorreram em barricas de madeira, numa sala com temperatura controlada.

Para as fermentações alcoólicas foi utilizado um modelo de desenho de experiências com três fatores de dois níveis cada, para avaliar a importância de cada um dos fatores e como interfere na fermentação.

Seguiu-se então um total de oito fermentações alcoólicas, nas quais variavam os fatores: Temperatura, °Brix e tipo de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces bayanus*).

Foram ainda feitas mais três fermentações acéticas, também estas para avaliar se algum dos fatores apresenta melhor desempenho com o decorrer da fermentação acética.

Por fim, foi realizada uma fermentação alcoólica, com condições de temperatura menos favoráveis, mais uma vez para analisar se seria possível ocorrer a fermentação.

## 1.2- INOV'LINEA

O INOV'LINEA é parte integrante do TAGUSVALLEY – Tecnopolo do Vale do Tejo é um parque de Ciência e tecnologia, localizado em Alferrarede, no Conselho de Abrantes desde 7 de Novembro de 2003.



Figura 1: INOV'LINEA;

Fonte: (Pinheiro, 2011)

O Centro de Transferência de Tecnologia Alimentar, INOV'LINEA, é uma estrutura de apoio à inovação, focado na aplicação de novas tecnologias, desenvolvimento de novos produtos e técnicas inovadoras no processamento e conservação de alimentos.

Tem como principais objetivos:

- O apoio a empresas do sector alimentar;
- O aumento da qualidade de produção e melhoria da competitividade do setor;
- Promoção de transferência de tecnologia e inovação na indústria alimentar.

As suas principais vertentes de atuação são:

- Desenvolvimento de novos produtos alimentares;
  - Desenvolvimento de novos processamentos e modos de conservação;
  - Valorização dos produtos tradicionais, enquadrados na dieta mediterrânea:
- Produtos Autóctones: Hortofrutícolas, como marmelo, romã, tomate, diospiro;
  - Azeites e azeitonas;
  - Carnes, como enchidos, preparados e outros.

O INOV'LINEA, trabalha de forma intensiva a vertente da inovação com a aplicação de conhecimento científico de processo I&D, e responde às necessidades concretas do mercado das empresas do setor Agroalimentar.

Possui ainda, um vasto conjunto de serviços, como:

- Apoio à criação de novos negócios alimentares;
- Apoio técnico especializado;
- Desenvolvimento e/ou reformulação de produtos (Tagusvalley, 2017).

## **1.3- Fundamentos Teóricos**

### **1.3.1- O Vinagre**

A palavra vinagre derivada do idioma Francês *vinaigre*, que significa “vinho azedo”, é um condimento obtido pelo processo de fermentação acética, que consiste na transformação do álcool em ácido acético, pela ação de bactérias acéticas. Juntamente com o vinho, foram os primeiros produtos de fermentação espontânea utilizados pelo homem na sua alimentação (Schmoeller & Balbi, 2010).

Entre as principais aplicações, pode-se salientar a utilização como condimento, pois a sua principal finalidade é atribuir gosto e aroma aos alimentos, mas também é utilizado como aromatizante, conservante, bebida refrescante e medicamento.

As primeiras referências da existência de vinagre datam de 8000 anos a.C. Na época, tratava-se de um condimento muito aproveitado devido às propriedades benéficas ao organismo humano e à sua importância na alimentação. Foi muito utilizado como bebida refrescante, diluído na água e também como medicamento. Foi recomendado, também, para tratar de disfunções respiratórias, feridas e úlceras, devido às suas propriedades desinfetantes e anti-inflamatórias.

Nas epidemias de cólera que ocorreram, o vinagre foi utilizado para desinfecção, para isso recomendavam lavar as mãos antes e depois de visitar um doente e lavar as frutas e verduras antes do consumo. Estudos posteriores demonstraram que um vinagre com 5% de ácido acético é letal para os vibriões da cólera, quando em contato por cinco minutos (Rizzon & Meneguzzo, 2002).

O vinagre é uma solução diluída de ácido acético, resultado de dois processos consecutivos: a fermentação alcoólica, representada pela conversão de açúcar em etanol (álcool) e da fermentação acética, que corresponde à transformação do álcool em ácido acético com a atuação de bactérias acéticas. Essas bactérias pertencem à família *Pseudomonadaceae* e aos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. As principais espécies de bactérias acéticas são: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter schützembachii* e *Gluconobacter oxydans* (Schmoeller & Balbi, 2010).

A bactéria acética ideal é aquela que resiste à elevada concentração de álcool e de ácido acético, com pouca exigência nutritiva, elevada velocidade de transformação do álcool em ácido acético, bom rendimento de transformação, sem hiperoxidar o ácido acético formado, além de conferir boas características gustativas ao vinagre (Rizzon & Meneguzzo, 2002).

### **1.3.2- Legislação e Qualidade do Vinagre**

O Decreto-Lei nº 174/2007 de 8 de Maio, decreta as normas a que deve obedecer o fabrico e comercialização de vinagre em Portugal.

Tendo em conta o decreto de lei em questão, entende-se por “vinagre” o produto obtido unicamente pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola.

De acordo com a origem os vinagres classificam-se:

- Vinagre de vinho: vinagre obtido exclusivamente do vinho pelo processo biológico de fermentação acética;
- Vinagre de fruta e vinagre de bagas: vinagre obtido da fruta ou bagas de fruta pelo processo biológico de fermentação alcoólica e acética;
- Vinagre de sidra: vinagre obtido da sidra pelo processo biológico de fermentação acética;
- Vinagre de álcool: vinagre obtido do álcool destilado de origem agrícola pelo processo biológico de fermentação acética;
- Vinagre de cereais: vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cereais cujo amido tenha sido convertido em açúcares pela diástase de cevada maltada ou por qualquer outro processo;
- Vinagre de malte: vinagre obtido, sem destilação intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação, alcoólica e acética, de cevada maltada com ou sem a adição de cereais, cujo amido foi convertido em açúcares unicamente pelo processo da diástase de cevada maltada;
- Vinagre de malte destilado: vinagre obtido pela destilação de vinagre de malte, sob pressão reduzida, contendo apenas os constituintes voláteis do vinagre de malte de que deriva;
- Outros vinagres: vinagres de outros produtos de origem agrícola de dupla fermentação não contemplados nas alíneas anteriores, designadamente de mel, de cerveja, entre outros;
- Vinagres aromatizados e vinagres com especiarias: os vinagres referidos nas alíneas anteriores, aos quais sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis.

Relativamente às matérias-primas o decreto-lei estabelece que, as mesmas só podem ser utilizadas no fabrico do vinagre se estiverem em conveniente estado de

conservação e se apresentem isentas de substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição, assim como de microrganismos patogénicos ou de derivados destes, em níveis que prejudiquem a saúde humana.

No setor vitivinícola só podem ser utilizados vinhos cujas características estejam de acordo com o estabelecido na legislação em vigor, podendo, contudo, apresentar excesso de acidez volátil.

Na preparação do vinagre é permitida a adição de plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, sumos de fruta ou concentrados de sumo de fruto, mel, açúcar e sal.

Na preparação do vinagre é proibida a adição de aromatizantes artificiais, óleos de grainha de uva, naturais ou artificiais, resíduos de destilação, resíduos de fermentação ou os seus subprodutos, substâncias extraídas de bagaço de todos os tipos, ácidos e todos os tipos (com exceção daqueles naturalmente contidos nas matérias primas utilizadas ou contidos em qualquer substância cuja adição nestas seja permitida, como sejam, designadamente, os aditivos).

De acordo com o decreto-lei os vinagres devem apresentar as seguintes características:

- Acidez total (g/L ácido acético)
- Vinagre de vinho - mínimo 60g/L;
- Outros vinagres - mínimo 50g/L.
- Álcool residual (%; v/v):
- Vinagre de vinho – máximo 1,5%;
- Outros vinagres – máximo 0,5%.
- Aspeto:
- Vinagre de vinho – límpido, podendo admitir-se ligeiro depósito ou turvação.
- Cor, aroma e sabor:
- Vinagre de vinho – próprios da natureza da matéria-prima e dos ingredientes facultativos indicados no rótulo.

### 1.3- Fermentação

A fermentação é um processo no qual, há liberação de energia que ocorre sem a participação do oxigênio, trata-se dum processo anaeróbio. A fermentação compreende um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, havendo deste modo, liberação de energia. A glicose é uma das substâncias mais utilizadas pelos microrganismos como ponto de partida na fermentação.

Cada molécula de glicose é desdobrada em duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico) e há liberação de hidrogênio e energia, por meio de várias reações químicas. O hidrogênio combina-se com moléculas transportadores do mesmo (NAD), formando  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , ou seja  $\text{NADH}_2$  (Sobiologia, sd).

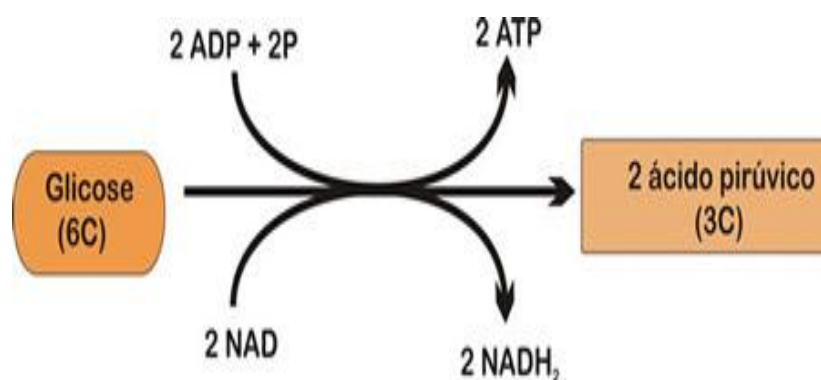


Figura 2 - Esquema de processo de fermentação

Fonte: (Sobiologia, sd)

#### 1.3.1- Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é utilizada há muitos anos. Há mais de 4000 anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. No entanto, apenas recentemente foi possível relacionar a fermentação com as leveduras, fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias (Mongelo, 2012).

A fermentação compreende um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples libertando energia. O processo tem início com a ativação da glicose, que recebe em reações

sucessivas dois fosfatos energéticos, fornecidos por duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) que se transforma em ADP (adenosina difosfato). A glicose, por sua vez, é transformada em gliceraldeído 1,3-difosfato. No final, cada gliceraldeído é transformado em ácido pirúvico. O rendimento é de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada (Corazza *et al*, 2001).

O processo descrito está representado pelo esquema da figura 3, apresentada de seguida.

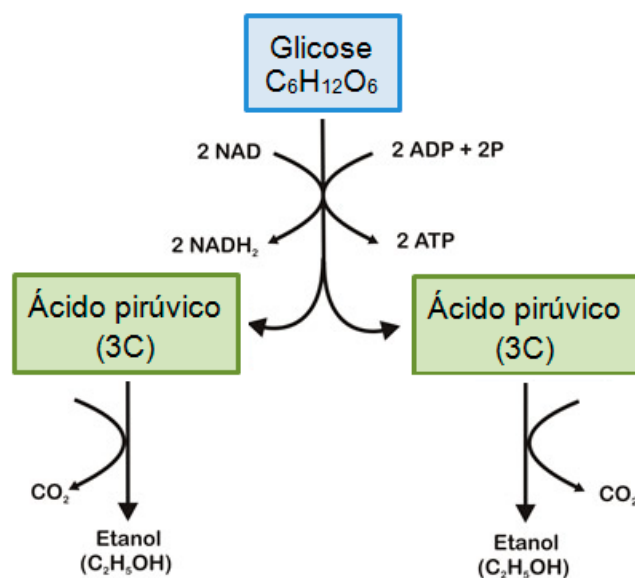


Figura 3 - Esquema Fermentação Alcoólica

Fonte: (Lima, 2014)

A fermentação dos mostos realiza-se em três fases: pré-fermentação, fermentação principal e pós-fermentação. A pré-fermentação inicia-se quando as leveduras que contêm o fermento são adicionadas ao mosto devidamente preparado. Esta fase é caracterizada pela elevada multiplicação das células e pelo aumento lento e gradual da temperatura do meio. Segue-se um período caracterizado pela formação de pouca espuma e inicia-se a fermentação principal. Reconhecida pela rápida elevação da temperatura, queda da densidade do mosto por redução dos açúcares e formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se e baixa o pH, consequentemente. Esta fase termina quando as espumas desaparecem.



A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminui a libertação de CO<sub>2</sub> e não há formação de novas espumas (Mongelo, 2012).

- **Fatores que afetam a Fermentação Alcoólica**

A fermentação é uma das principais etapas e destaca-se pela conversão do substrato açucarado em etanol e outros compostos desejados. Assim sendo, alguns fatores exigem um controlo mais rigoroso, como por exemplo a temperatura, pH, nutrientes, contaminação bacteriana, a concentração de etanol no meio a fermentar e a presença de oxigénio, pois interferem diretamente na fermentação alcoólica (Sousa & Monteiro, 2011).

### **Influência da Temperatura**

A temperatura ótima de fermentação depende da concentração de etanol no meio, diminui com o aumento do teor alcoólico. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se entre os 26 e os 35°C, contudo, a temperatura nas destilarias alcança os 38 °C. Temperaturas acima destas favorecem o desvio da via metabólica das leveduras com a produção de subprodutos indesejáveis, além disso, altas temperaturas levam a maiores perdas de etanol por evaporação em dornas abertas. Para células de leveduras imobilizadas há uma maior tolerância a altas temperaturas (Sousa, 2016).

### **Influência do pH**

Para que ocorra um bom processo de fermentação o pH deve apresentar um valor adequado para as leveduras, em torno de 5 a 6, que é considerado um valor ótimo para o crescimento das mesmas. O pH ideal para a produção de etanol, a partir de leveduras do género *Saccharomyces cerevisiae*, deve apresentar valor em torno de 4,5 (Sousa & Monteiro, 2011).

Outros autores defendem que o pH ótimo para fermentação está entre 4 e 5. Para processos com reciclo de células, faz-se o tratamento das mesmas com ácido sulfúrico (pH de 2 a 3,2) para redução da carga microbiana. Geralmente, fermentações conduzidas em meios ácidos conduzem a maiores rendimentos de etanol, pois restringem o crescimento celular e reduzem a produção de glicerol e também a contaminação bacteriana. Fermentações com uma faixa de pH abaixo da citada anteriormente, além de ocasionarem

perda de nutrientes como nitrogénio e potássio, aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) (Sousa, 2016).

### **Influência dos Nutrientes**

Os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetam a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes no mosto é importante, pois se estiverem presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, vai-se refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo.

Uma alta concentração, resulta num alto teor alcoólico, que pode ser tóxico para a levedura, pois desestabiliza a membrana plasmática. Por outro lado, isto é benéfico, pois controla a multiplicação excessiva, o que ocasiona desvio de açúcar para a produção de biomassa em detrimento ao álcool.

A falta de nutrientes pode afetar consideravelmente o rendimento alcoólico e a viabilidade celular da levedura. No caso quando uma quantidade de nutrientes é insuficiente, o fermento reproduz e conduz a fermentação lentamente ou então a reprodução é mesmo impossível (Sousa & Monteiro, 2011).

### **Contaminação (Bactérias e Leveduras)**

A presença de microrganismos patogénicos na fermentação alcoólica é o mais frequente interferente do processo. Estes podem ser habitantes naturais da matéria-prima utilizada para o meio fermentativo e/ou provenientes do processo de extração do mesmo. Portanto, deve haver uma boa assepsia tanto das dornas quanto dos demais equipamentos do processo.

Os efeitos da contaminação bacteriana, como consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento inibição e queda da viabilidade das leveduras, devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio durante a fermentação, são visíveis pelas perdas de rendimento e devem ser previstas no controlo de processo (Sousa, 2016).

### **Concentração do Etanol**

O aumento da concentração de etanol durante a fermentação pode causar inibição no metabolismo da levedura. Os fatores que influenciam a sensibilidade ao etanol (temperatura, presença de oxigénio, composição do meio) atuam direta ou indiretamente

sobre as propriedades da membrana plasmática, desnaturando-as e diminuindo a produtividade (Sousa, 2016).

### **Presença de oxigénio**

O oxigénio é necessário ao desenvolvimento das leveduras no processo de multiplicação, principalmente na fase inicial da fermentação dado que as condições de anaerobiose induzem a formação de etanol e de dióxido de carbono. (Sousa & Monteiro, 2011).

- **Leveduras utilizadas na Fermentação Alcoólica**

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de levedura utilizada há milhares de anos na panificação e na fermentação de bebidas alcoólicas, sendo a levedura fermentativa mais utilizada, nos últimos anos tem sido utilizada também para produção de bioetanol. É também importante como organismo modelo quer em estudos fisiológicos, quer na área de Biologia Celular e Molecular, sendo o microrganismo eucariótico mais estudado e aquele cujo genoma foi o primeiro a ser sequenciado (Viana, 2009).

Muitos genes humanos que são homólogos aos genes da levedura foram identificados em relação à divisão celular, sinalização celular, processamento de proteínas, entre outros, devido às suas semelhanças. As células da levedura existem de duas formas: haploides e diploides. As células haploides crescem e sofrem divisão de mitose. Em condições de stress, as células diploides sofrem meiose e são convertidas em células haploides sofrendo um crescimento adicional (Saraswathy & Ramalingam, 2011).

A figura que se segue (figura 4) apresenta um exemplo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 4: Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: (Labnetwork, 2016)

Em termos industriais a *S. cerevisiae* expressa fenótipos importantes em processos comerciais, como a rápida e completa fermentação do açúcar, aumento da produção e tolerância do álcool, formação de aromas e aromas desejados, floculação melhorada, capacidade de utilizar dissacarídeos e trissacarídeos, baixa propensão à espuma entre outros. A diversidade genética e fenotípica da *S. cerevisiae* representa adaptações em ambientes industriais, como cervejarias, vinícolas e padarias, bem como uso repetido em processos industriais. Devido às suas propriedades fisiológicas desejáveis e métodos estabelecidos para a manipulação genética *S. cerevisiae*, deve continuar a ser o organismo desejado para muitas aplicações industriais, incluindo as que se estendem para além da biotecnologia de levedura "clássica" de alimentos, bebidas e processos de alimentação (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011).

### ***Saccharomyces bayanus***

A *saccharomyces bayanus* é uma espécie de levedura cuja sua linhagem ainda não foi estudada com precisão, inclui linhagens geneticamente diversas, puras e híbridas.

No entanto, é uma levedura do género *Saccharomyces*, e é usada na vinificação e fermentação de sidra. Está estreitamente relacionada com *Saccharomyces cerevisiae*. Possui diferentes estirpes, com diferentes características genéticas e metabólicas, que podem ter uma origem híbrida. Na atual classificação *S. bayanus* pode ser mais corretamente considerada como um complexo de espécies.

### 1.3.2- Fermentação Acética

Os fermentados acéticos ou vinagres são produzidos por dois processos bioquímicos distintos, ambos resultantes da ação de microrganismos, sendo a fermentação alcoólica pela ação de leveduras sobre matérias-primas açucaradas e amiláceas e a fermentação acética, pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*, pertencentes à família *Pseudomonaceae* (Alvarenga, 2014).

Na fermentação acética o etanol é oxidado a ácido acético. Essa etapa é feita por bactérias acéticas em meio aeróbio. Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidades de outros produtos como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante (Suman, 2012).

Para a fermentação acética não é comum o uso de culturas puras. Utiliza-se uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada a mais eficiente (Suman, 2012). Deste modo, após terminar a fermentação alcoólica, inocula-se o vinho com essa mistura de bactérias úteis e ativas adiciona-se “vinagre forte”, que é o vinagre não diluído e não pasteurizado de uma fermentação anterior, que contém altas concentrações de bactérias acéticas.

- **Bactérias acéticas**

As bactérias que produzem ácido acético são gram-negativas ou gram-variáveis, aeróbias, não formadoras de esporos e apresentam-se na forma de bastonetes elipsoidais que podem ocorrer sozinhos, em pares ou em cadeias. Seus tamanhos variam entre 0,4-1 µm de largura e 0,8-4,5 µm de comprimento. São catalase positiva e oxidase negativa. O pH ótimo para o crescimento é de 5 a 6,5, no entanto, também podem crescer em valores de pH entre 3 e 4. Podem apresentar flagelos polares ou peri tríquios.

Há pouco tempo atrás, eram classificadas em dois gêneros: *Acetobacter* e *Gluconobacter*, porém atualmente outros dez gêneros pertencentes anteriormente à família *Alphaproteobacteria* foram acomodados na família *Acetobacteraceae*: *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia* e *Ameyamaea*, sendo as oito últimas de ocorrência bastante rara em vinagres, vinhos e frutas. As principais representantes das bactérias acéticas pertencem ao gênero *Acetobacter* e são usadas desde os primórdios para a produção do vinagre por fermentação (Zilioli, 2011).

- **Fatores que afetam o desempenho da fermentação acética**

A fermentação acética deve ser processada tendo em conta alguns fatores que prejudicam o trabalho das bactérias ou, a qualidade do vinagre, se não forem devidamente controlados. Os principais fatores são: a concentração alcoólica, acidificação inicial, ausência de oxigénio, perturbação da película de bactérias, temperatura e pH. A produção de um bom vinagre depende de uma série de fatores como a linhagem e a seleção do microrganismo, a matéria-prima, a concentração do álcool, a temperatura de fermentação (na faixa de 20 ° a 30 °C), a quantidade de O<sub>2</sub>, pH ótimo na faixa de 5 e 6, a maturação e a conservação, a clarificação, o envase, e a pasteurização (Suman, 2012).

### **Temperatura**

As bactérias envolvidas na preparação do vinagre têm nítida preferência a determinadas temperaturas de crescimento. Desenvolvem-se rapidamente entre 27 a 30°C e crescem lentamente abaixo desse limite, e acima mostram-se fracas, podendo perder a capacidade funcional se não retornarem ao seu ótimo de temperatura. Não existem referências específicas a nenhuma temperatura mínima para viabilidade, mas é considerado que um crescimento abaixo de 10°C dificilmente seja possível. Do mesmo modo, não existem dados viáveis sobre a temperatura máxima, mas presume-se que seja por volta de 35°C.

### **pH**

Em termos de pH a bactéria acética pode mostrar crescimento ótimo entre 5 e 6,5, embora mostre grande capacidade de sobreviver em pH entre 3 e 4.

### **Concentração alcoólica**

O teor alcoólico afeta muito o desenvolvimento das bactérias ou a qualidade do vinagre, sendo que concentrações acima de 13% de álcool dificultam a acetificação, sendo o álcool oxidado de maneira incompleta.

Concentrações muito baixas resultam em vinagres fracos, neste caso há necessidade de correção com álcool. Já as concentrações elevadas são tóxicas para as bactérias acéticas, dificultando a fermentação, neste caso há necessidade de diluição com água ou o uso de culturas tolerantes à alta concentração alcoólica (Gomes *et al*, 2013).

### **Perturbação da película de bactérias**

As bactérias nos processos lentos desenvolvem-se em forma de uma fina película sobrenadante chamada “mãe do vinagre”, que é constituída por bactérias acéticas e uma substância gelatinosa produzida pelos próprios microrganismos que se mantém em contato com o ar ambiente. A perturbação dessa película pode levar ao rompimento e, conseqüente, imersão. Submersas, as bactérias continuam a utilizar os elementos nutritivos da matéria-prima, porém pela privação do ar, deixam de produzir ácido acético.

### **Ausência de oxigénio**

A acetificação do álcool é primordialmente uma oxidação e depende do oxigénio para decorrer normalmente.

Por se tratar de microrganismos aeróbios necessitam de uma quantidade adequada de O<sub>2</sub> para que a fermentação ocorra normalmente. A velocidade da fermentação vai depender da quantidade de ar fornecida bem como da transferência do mesmo às bactérias. No entanto, se o oxigénio for excessivo pode levar à perda de álcool por evaporação, com o aumento exagerado da temperatura pelo excesso de atividade metabólica e perda de ácido acético por oxidação (Gomes *et al*, 2013)

- **Processos de Acetificação**

Os principais processos industriais utilizados para a fabricação de vinagres são baseados nos métodos de Orleans, Alemão ou Submerso.

### **Processo Lento, Orleans ou Francês**

O processo Orléans é o mais antigo e tradicional método de produção de vinagre. Consiste em favorecer o contato do ar com uma fina camada gelatinosa, que se mantém na superfície do vinho (mãe do vinagre). O vinho é colocado em barris de madeira adaptados e designados de acetificadores, para acetificar.

A figura 5 mostra fragmentos da “mãe do vinagre” retirada de uma das barricas onde decorria a fermentação acética.



Figura 5: “Mãe do vinagre” retirada da barrica da fermentação acética 4.2, no final da fermentação

Conhecido e utilizado desde a antiguidade, o seu aperfeiçoamento tecnológico iniciou-se há cerca de 200 anos, ao observar-se barricas que continham vinho não estavam cheias, apresentavam “avinagramento” mais rápido devido à maior superfície de contato com o ar, e, portanto, sujeita a um maior arejamento (Suman, 2012).

O vinagre é elaborado em barris de mais ou menos 200 litros de capacidade, providos de duas aberturas nas extremidades cobertas com tecido e um tubo em forma de J até ao fundo. As aberturas laterais permitem a entrada de ar necessário para a oxidação acética mas impedem ao mesmo tempo a entrada de insetos e outros corpos estranhos. O tubo em forma de J serve para a adição de vinhos sem rutura da película sobre o líquido (“mãe do vinagre”) ou movimentação de partículas já decantadas (Takemoto, 2000).

A figura 6, apresentada de seguida, exemplifica uma dessas barricas, onde são visíveis todos os orifícios que são falados e também o nível a que a barrica deve de funcionar.



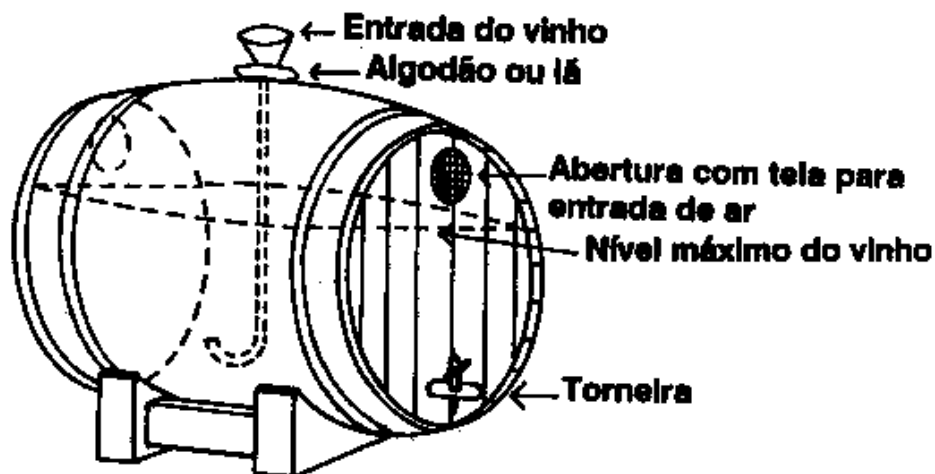


Figura 6: Processo tradicional de acetificação

Fonte: (Rizzon & Meneguzzo, 2002)

O procedimento consiste em colocar no barril cerca de um terço de sua capacidade com vinagre, e vão sendo adicionadas quantidades de vinho ou o fermentado de fruta entre 10 a 15 litros por semana, durante um mês. Ao fim de quatro semanas já se podem extrair cerca de 15 litros de vinagre, substituindo-se por outro tanto de vinho novo, repetindo-se desta forma o processo ao longo do tempo (Suman, 2012).

A temperatura ambiente para este processo não deve exceder 25°C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação.

O vinagre produzido por este método tem qualidade considerada superior à do obtido por outros métodos, isto porque ocorre o amadurecimento natural no vinagre, antes de ser retirado das barricas. Este amadurecimento reduz o sabor picante, próprio dos vinagres recém produzidos, torna o líquido mais suave e consequentemente, mais agradável. O envelhecimento permite a lentidão das transformações químicas, transformando resíduos de acetaldeído, etanol, ácido acético e outros, produzindo ésteres e hemi-acetais, de sabores e odores mais agradáveis (Zilioli, 2011). No entanto, este tipo de processamento é de baixa produtividade, ocupa muito espaço e atualmente é usado exclusivamente para a produção doméstica. (Suman, 2012).

Este processo também conhecido como processo tradicional, foi o utilizado no trabalho em questão, mas em escala mais reduzida barricas de 10 L, em vez de 200L como é referido no texto acima.

### **Processo Rápido ou Alemão**

Os processos rápidos são bastante utilizados atualmente. Foram idealizados por Boerhave no começo do século XVIII, ao descobrir que a transformação do vinho de maçãs em vinagre era bastante rápida quando deixava passar o vinho, através de um recipiente cheio de bagaços de maçã (Takemoto, 2000).

Atualmente são utilizados recipientes geradores, empacotados com diversos tipos de material de enchimento (por exemplo, a madeira). As bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam etanol a ácido acético. A matéria-prima é recirculada desde a parte inferior da tina até a parte superior. Este material passa pela madeira, sabugo ou carvão, onde as bactérias acéticas se fixam, transformando o conteúdo alcoólico em ácido acético. A recirculação ocorre quantas vezes forem necessárias até a total transformação. Uma vez ocorrido o processo total, metade da tina de depósito é descarregada, voltando a introduzir a mesma quantidade de vinho base (Suman, 2012).

Os geradores têm tamanhos e formas diferentes. O tamanho varia entre 15 a 30 cm de diâmetro por 20 a 60 cm de altura. Têm forma cilíndrica e um suporte perfurado que sustenta o material de enchimento no fundo. Pelos orifícios de suporte, passa o ar a ser utilizado na oxidação. O material de enchimento tem de permitir o contato íntimo entre líquido e ar, de forma a facilitar as trocas, são utilizadas fibras de coco, carvão-coque, sabugo de milho ou outras. A acidez aumenta progressivamente conforme o líquido vai sendo passado. Sendo o processo exotérmico, o líquido deve ser resfriado antes de entrar novamente para o gerador (Suman, 2012).

O processo alemão apresenta inconvenientes. Está sujeito a gravíssimas infestações por insetos e moscas. Isso acaba forçando a desativação total do recipiente, obrigando o produtor a esterilizar todo o meio de enchimento, por vapor ou assepsia com etanol. É também frequente o entupimento total dos locais de passagem do mosto e do ar, em virtude do crescimento incontrolável de bactérias acéticas indesejáveis. Neste caso, existe a necessidade de substituição anual de todo o material (Zilioli, 2011).

### **Processo submerso**

O desenvolvimento da indústria vinagreira foi muito lento devido ao baixo valor do produto e ao caráter artesanal das fábricas. Somente no século XX, em 1932, um alemão chamado Frings patenteou um modelo de acetificador provido de dispositivos para

controle da temperatura, de arejamento forçado e para a renovação semicontínua da carga de vinho-vinagre (Takemoto, 2000).

Na produção de vinagre por este processo, as bactérias acéticas encontram-se submersas no mosto, multiplicando-se e retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Para catalisar essa reação, que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua e adequada de oxigénio em todos os pontos do tanque. Breves interrupções no fornecimento de oxigénio, sobretudo nas fases finais de fermentação, afetam quase definitivamente o rendimento (Zilioli, 2011).

A diferença deste método para o processo alemão é o fato da cultura de microrganismos estar submersa sem a presença de nenhum suporte (material poroso).

O processo de acetificação é exotérmico e assim, deve permitir, através de serpentina, a dissipação térmica, possibilitando, dessa forma, o controle da temperatura dentro de uma faixa conveniente. O ótimo de temperatura de fermentação depende da concentração do substrato, sendo a mesma por volta de 28°C. Um disco giratório no espaço livre do tanque evita a formação de excessiva espuma (Suman, 2012).

O processo de fermentação submersa apresenta uma série de vantagens como, alta eficiência, dispensa tratamentos de clarificação e de filtração. A produtividade média desses acetificadores é igual a 1/4 de seu volume útil em litros de vinagre a 10% ao dia (Suman, 2012). Outra vantagem oferecida pelo método é o menor espaço ocupado pelo acetificador (Takemoto, 2000).

#### **1.3.4- Matéria-prima**

Qualquer fonte de hidratos de carbono fermentável pode ser usada na produção de vinagre. Um pouco por todo o mundo, diversas matérias-primas têm sido usadas, sendo o vinho (uvas) considerado o mais tradicional. Também são considerados vinagres tradicionais os vinagres feitos a partir de sidra (maçãs), saquê (arroz) e cerveja (malte), porém diversas fontes não tradicionais têm sido citadas na literatura científica, como laranja, mel, manga, banana, abacaxi, amora, caju, tamarindo, kiwi, maracujá, jabuticaba e cebola. No Brasil a imensa maioria dos vinagres produzidos tem com matéria-prima o etanol de cana-de-açúcar e nos Estados Unidos o vinagre de etanol de cereais, especialmente o de milho é produzido em larga escala (Zilioli, 2011).

A laranja (*Citrus sinensis*), pertencente à família *Rutaceae*, é originária da Ásia e é uma das principais frutas produzidas no mundo. Os ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos estão entre os principais constituintes das frutas cítricas. A sua natureza e concentração interferem diretamente no sabor característico e qualidade sensorial. Os principais ácidos orgânicos de frutas cítricas são os ácidos cítrico e málico. O teor de voláteis do sumo de laranja pode ser alterado a partir da fermentação alcoólica, devido à produção de novos compostos pelo metabolismo das leveduras, como álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas e ésteres, sendo estes últimos de particular importância. Nos últimos anos foi dada uma atenção especial aos compostos fenólicos das frutas cítricas, pois há fortes indícios de que estes possam desempenhar um importante papel na capacidade antioxidante destas frutas (Zilioli, 2011).

## **Laranja**

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira, uma árvore da família das *Rutáceas*. Trata-se de um fruto híbrido, criado na antiguidade a partir do cruzamento do pómulo com a tangerina.

A laranja foi trazida da China para a Europa, no século XVI, pelos portugueses. Na segunda metade do século XIX descobriu-se na Baía, no Brasil, uma laranja que era mais doce, sumarenta e agradável à vista, sem caroços e com um umbigo no extremo oposto ao pedúnculo. Foi levada para os Estados Unidos da América, donde se converteu anos mais tarde na rainha das laranjas, a variedade conhecida como *Washington Nave* (Omaiaa, 2011).

É uma fruta muito rica em vitamina C e em minerais como Cálcio, Ferro e Fósforo. Também é fonte de vitaminas A e do complexo B.

Entre as múltiplas funções, a vitamina C ou ácido ascórbico tem a capacidade de combater os radicais livres, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante. A vitamina C também ajuda na resistência a infeções, pode atuar na diminuição do risco de doenças cardiovasculares, no tratamento da hipertensão, entre outros.

As principais variedades produzidas no nosso país são: a *Baía* (Washington Navel), *Newhall*, *Dalmau* (Navelina), *Lane Late*, *Navel Late*, *Rhodee Barnfield*, *Valência Late* (clones: D. João, Frost, Olinda), *de Setúbal* e *Jaffa*.

Em Portugal, a comercialização ocorre durante todo o ano, graças à utilização de variedades temporãs de meia estação e tardias. As variedades *Dalmau* e *Newhall* têm a sua época de produção entre Novembro e Março, quanto às variedades *Baía* e *Jaffa* de Fevereiro e Abril e as *Valencia Late* e *Lane Late* desde Março a Agosto, estas últimas são exclusivamente da região algarvia.

Normalmente a comercialização da laranja é efetuada após a colheita, pois as estruturas de frio são escassas, recorrendo-se a estas apenas no caso de excesso de oferta e apenas para conservação, uma vez que a laranja não amadurece após a colheita (Omaiaa, 2011).

A laranja é um dos frutos com maior protagonismo na gastronomia, dado que se emprega nas diferentes cozinhas internacionais para acompanhar diversos pratos, na confeção de bolos, tortas, biscoitos, batidos e salada de fruta. É também um ingrediente fundamental nos molhos agri-doces típicos da cozinha oriental, como acompanhamento para pratos de carne.

- **Laranja utilizada**

#### **Newhall**

A variedade de laranja '*Newhall*' é um fruto de tamanho médio a grande, com forma oblonga a elipsoide, umbigo pequeno e casca cor de laranja intenso. A polpa é de textura média e sabor agradável, com 10 a 12 gomos e não contém sementes. O teor em sumo varia entre 35% a 45 %. A época de maturação vai de Outubro a Fevereiro (Frustock, sd).

#### **Pala**

A laranja “Pala” é um fruto de tamanho muito irregular, varia de pequeno a médio e grande consoante a altura do ano em que é colhido. A colheita desta laranja é feita durante praticamente todo o ano.

Variedade típica do norte, mais especificamente da Quinta da “Casa do Vale”. Tal como no tamanho a nível de estrutura e sabor também é uma laranja difícil de caracterizar, apresenta um °Brix que varia de 11 a 16°Brix, alguns exemplares mais sumarentos outros menos, dependendo também da altura do ano em que são colhidos, assim como as grainhas não são uma característica comum. Laranja com a qual se pretende desenvolver o processo.



## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho realizado baseou-se essencialmente em fermentações alcoólicas e acéticas da matéria-prima em estudo, ou seja da laranja, tendo em conta o principal objetivo do trabalho, ou seja, o desenvolvimento de um produto alimentar, nomeadamente o vinagre de laranja e mel.

Realizaram-se no total doze fermentações alcoólicas e cinco acéticas. Sendo três alcoólicas e duas acéticas consideradas ensaios preparatórios.

As fermentações alcoólicas ocorreram num depósito de plástico a temperaturas diferentes, numa estufa climatizada. As acéticas foram realizadas em barricas de madeira, pelo processo de Orléans.

Para o desenvolvimento do trabalho seguiu-se o diagrama de blocos apresentado na figura 7:

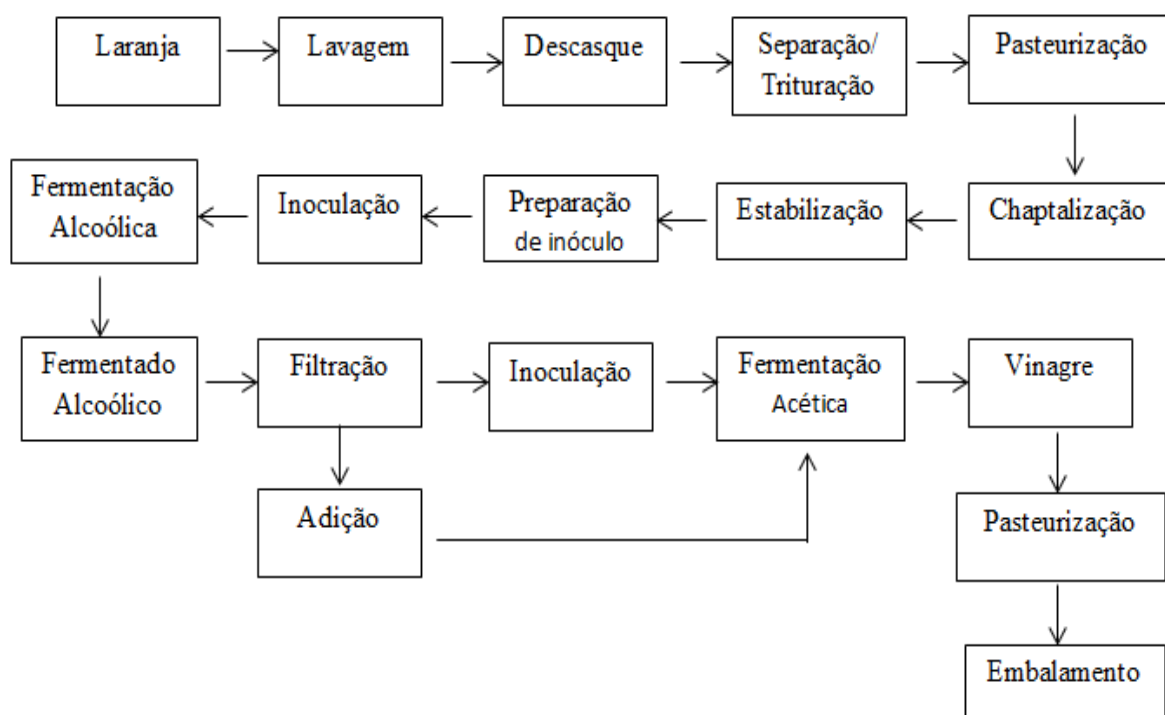


Figura 7: Diagrama de blocos utilizado para o processo em desenvolvimento

## 2.1- Preparação da Matéria-prima

Antes de iniciar o processo a matéria-prima exige alguns cuidados e preparação no sentido de diminuir a probabilidade de haver contaminações.

O primeiro passo do processo consiste na lavagem da matéria-prima com algum tipo de desinfetante. Para a lavagem o equipamento utilizado é uma cuba de lavagem, para tornar o procedimento mais rápido e eficiente. A cuba utilizada está representada na figura 8.



Figura 8: Cuba de lavagem utilizada

Após a lavagem segue-se o descasque, onde é retirada a casca à matéria-prima manualmente.

A separação e trituração são realizadas com o auxílio de um equipamento específico de separação e trituração, como por exemplo uma máquina de sumos. Nesta fase, peles e grainhas são separadas do sumo final. A figura 9 apresenta o equipamento utilizado.





Figura 9: Máquina de sumos utilizada

Após a obtenção do sumo, este é colocado num recipiente e são efetuadas análises de pH e °Brix, para determinar as condições iniciais do sumo. A medição de pH é feita com um potenciômetro, os graus Brix são medidos com o auxílio de refratômetro.

Segue-se a pasteurização do sumo obtido, durante 30 minutos a uma temperatura de 70°C. O equipamento utilizado nesta tarefa é um robô de cozinha.

Este procedimento é necessário para, mais uma vez minimizar os riscos de contaminação.

Para a Chaptalização é necessário que a matéria-prima esteja á temperatura ambiente, logo há um período de espera até que arrefeça, por vezes é necessário refrigerar para acelerar o processo.

A análise do açúcar é efetuada com o auxílio de um refratômetro, o qual mede o °Brix, como já foi referido. O teor de açúcares varia consoante a fruta, e mesmo quando se trata da mesma fruta este parâmetro varia. No caso específico da laranja utilizada os graus Brix variam entre os 11 e os 16 °Brix de colheita para colheita.

Foi feito o acerto dos °Brix, com mel, para um valor entre 17 e 19°Brix consoante o ensaio e as condições em que se pretendia trabalhar. Não foi determinada a quantidade de mel a adicionar, este era adicionado aos poucos até atingir os °Brix pretendidos.

Após a preparação da matéria-prima, segue-se um período de estabilização no qual o sumo é colocado num depósito de plástico onde decorre a fermentação alcoólica.

## 2.2- Fermentação Alcoólica

Na fermentação alcoólica foram testadas duas leveduras distintas, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces bayanus* com o intuito de determinar a mais adequada ao trabalho em questão.

### Preparação do inóculo

Considerando a *Saccharomyces cerevisiae*, esta necessita de um período de ativação de 15 a 30 minutos a 37°C, de acordo com as indicações do fabricante. A quantidade de levedura a utilizar também é determinada de acordo com o especificado na embalagem, neste caso 20g para cada 100 L.

No caso da *Saccharomyces bayanus*, mais uma vez de acordo com as indicações do fabricante, necessita de um período de ativação de 15 a 30 minutos a 32°C.

Nesta fase são também preparados os nutrientes necessários à fermentação alcoólica, nas concentrações seguintes:

- Sulfato de Amónio – 0,2g/L
- Fosfato de Amónio – 1,0g/L
- Sulfato de Magnésio – 0,1g/L

### Inoculação

Depois das etapas de preparação do inóculo, é efetuada a inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou da *Saccharomyces bayanus* e inicia-se assim a fermentação alcoólica.

A fermentação alcoólica é acompanhada pela medição do pH e do °Brix até que este ultimo estabilize.

Durante a fermentação alcoólica também vai sendo determinado o teor alcoólico com o auxílio de uma ferramenta online, sabendo o °Brix é possível determinar o teor alcoólico. Quando estabiliza é novamente determinado o teor alcoólico e o mosto será posteriormente filtrado.

Os depósitos de plástico utilizados para a fermentação alcoólica, estão representados na figura seguinte (figura 10).



Figura 10: Depósitos de plástico utilizados na fermentação alcoólica

A filtração é realizada com o auxílio de um pano de queijo. O mosto resultante é armazenado em garrações de plástico e refrigerado. É também calculado o respetivo rendimento.

### 2.2.1- Ensaios Exploratórios

- **Fermentação alcoólica 1**

Esta primeira fermentação, feita para perceber os parâmetros mais relevantes a ter em conta e por onde começar a trabalhar no sentido da aproximação às condições reais que o processo está sujeito.

Inicialmente o °Brix apresentava um valor de 13°Brix antes da adição de açúcar e um pH de 3,65. Foram adicionadas 800g de açúcar a um volume de 10,2 L e passou para 18,5°Brix e um pH de 3,67.

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções referidas anteriormente.

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces bayanus*. A primeira inoculação foi feita dia 20 de fevereiro a uma temperatura de 28°C, como não fermentou, inoculou-se novamente no dia 22 de fevereiro, sendo a temperatura aumentada para 30°C.

- **Fermentação Alcoólica 2**

Na segunda fermentação o °Brix inicial foi 13,6 antes da adição de açúcar e um pH de 3,62. Foram adicionadas 450g de açúcar a um volume de 7,35 L e passou para 18,8°Brix e um pH de 3,65.

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções.

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces bayanus* 2,205g de acordo com as indicações da embalagem, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 30°C.

- **Fermentação Alcoólica (Mel)**

Foi a primeira fermentação na qual foi utilizado o mel como fonte de sacarose, depois de perceber como o processo decorria com a utilização do açúcar, é utilizado o mel para averiguar se o processo ocorre do mesmo modo.

O brix inicial do sumo era de 13°Brix e o pH de 3,70. Foram adicionados 1,5 kg de mel para um volume de 16 L, o Brix inicial da fermentação foi de 18,6 e o pH manteve o mesmo valor, ou seja 3,70.

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções.

A levedura utilizada foi novamente a *Saccharomyces bayanus* 4,814 g de acordo com as indicações da embalagem, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 30°C.

### **2.2.2- Ensaio Realizados**

Para estes ensaios era necessário avaliar alguns fatores, para determinar a ordem com que esses fatores seriam analisados, assim como a relevância dos mesmos foram utilizadas referências de um curso online “Experimentação para Aperfeiçoamento de Processos”. O que resultou numa experiência com três fatores de dois níveis cada um, o que dá um total de 8 combinações.

Tendo em conta o modelo, foram realizadas oito fermentações alcoólicas, nas quais variam os parâmetros apresentados na tabela seguinte.

Tabela 1: Parâmetros da fermentação alcoólica

Fermentação	Temperatura (°C)	Levedura	°Brix
Alcoólica 3.1	27	<i>S. bayanus</i>	17
Alcoólica 3.2	27	<i>S. cerevisiae</i>	17
Alcoólica 4.1	23	<i>S. bayanus</i>	17
Alcoólica 4.2	23	<i>S. cerevisiae</i>	17
Alcoólica 5.1	27	<i>S. bayanus</i>	19
Alcoólica 5.2	27	<i>S. cerevisiae</i>	19
Alcoólica 6.1	23	<i>S. bayanus</i>	19
Alcoólica 6.2	23	<i>S. cerevisiae</i>	19

Estes ensaios foram sempre realizados dois a dois, apenas uma das condições variava e a temperatura era igual para ambos.

- **Fermentação Alcoólica 3**

Inicialmente o sumo tinha 16,2°Brix, o que por si só já era um valor bastante elevado, a quantidade de mel adicionada foi apenas de 0,180 kg para um volume de 17 L, o °Brix subiu para 17 que era o valor pretendido e o pH passou para 3,60.

Efetuaram-se duas fermentações em simultâneo, ambas a 27°C, diferindo apenas na levedura, a fermentação 1 foi com a *Saccharomyces bayanus* e a fermentação 2 com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Fermentação 3.1 e 3.2:**

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respetivas proporções indicadas na “preparação do inóculo”.

- **Fermentação Alcoólica 4**

À semelhança da fermentação anterior e tal como nas seguintes foram feitas duas fermentações em simultâneo à mesma temperatura, neste caso 23°C, diferindo novamente na levedura, a fermentação 1 foi com a *Saccharomyces bayanus* e a fermentação 2 com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Relativamente á características iniciais do sumo, apresentava um °Brix de 16,0 e um pH 3,50. O Brix acertou-se com mel para os 17°Brix, mais precisamente 17,4 e foram

utilizados 0,280 kg de mel para um volume de 15 L, ou seja 7,5 L para cada uma das fermentações. O pH alterou-se para 3,53.

#### **Fermentação 4.1 e 4.2:**

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções, tal como referido na “preparação do inóculo.

#### **Fermentação Alcoólica 5**

Mais uma vez as duas fermentações ocorreram ao mesmo tempo e à mesma temperatura, neste caso 27°C, a levedura volta a ser diferente, a fermentação 1 foi com a *Saccharomyces bayanus* e a fermentação 2 com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Depois de pronto o sumo, apresentava um °Brix de 13,0 e um pH 3,75. O Brix foi corrigido com mel para os 19°Brix e foram utilizados 1,64 kg de mel para um volume de 16 L, ou seja 8 L para cada uma das fermentações. O pH alterou-se para 3,77.

#### **Fermentação 5.1 e 5.2:**

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções tal como está referido na “preparação do inóculo”.

- **Fermentação Alcoólica 6**

As duas fermentações ocorreram novamente em simultâneo e à mesma temperatura, neste caso 23°C, a levedura volta a ser diferente, a fermentação 1 foi com a *Saccharomyces bayanus* e a fermentação 2 com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Inicialmente o sumo, apresentava um °Brix de 12,0 e um pH 2,75. O Brix foi corrigido com mel para os 19°Brix e foram utilizados 2,04 kg de mel para um volume de 18 L, ou seja 9 L para cada uma das fermentações. O pH alterou-se para 3,73

#### **Fermentação 6.1 e 6.2:**

Foram adicionados os nutrientes necessários nas respectivas proporções.

## 2.3- Fermentação Acética

Foram realizadas cinco fermentações acéticas, duas das quais considerados ensaios exploratórios, decorreram em diferentes períodos de tempo, de acordo com as fermentações alcoólicas efetuadas.

Tal como foi referido a fermentação acética decorreu em barricas de madeira numa sala com temperatura controlada, entre 25 a 27°C. O pH foi medido diariamente, assim como a acidez total, que por sua vez determina o fim da fermentação acética quando os seus valores estabilizam.

A figura 11 apresenta duas das barricas utilizadas para a fermentação acética:



Figura 11: Barricas de madeira utilizadas na fermentação acética

Antes de encher as barricas, estas tem de ser previamente preparadas. Em primeiro lugar é necessário lavar, depois de lavadas são cheias com água quente para a madeira expandir evitando deste modo perdas de líquido pelas possíveis brechas que esta possa conter.

Como é possível ver na imagem anterior as barricas possuem um orifício na parte da frente e outro igual na parte de trás. Este tem de ser isolado de modo a que não entrem contaminações exteriores, como por exemplo moscas e mosquitos. No entanto não podem ser completamente tapados pois o processo necessita de oxigénio para que a fermentação ocorra, então é utilizada gaze, que devido á sua malha fina evita contaminantes mas deixa passar o ar.

Na parte superior da barrica é colocado o tubo em forma de J por onde é alimentada. Este não pode ser excessivamente grande de modo a tocar no fundo da barrica mas também não pode ser muito curto, para quando a barrica é realimentada não interferir com a película superior de baterias acéticas responsáveis pela produção do vinagre.

Quando a barrica não está a ser alimentada, o orifício do tubo também deve estar devidamente isolado, pelos mesmos motivos acima referidos.

### **Inoculação**

A inoculação é feita com vinagre não pasteurizado, numa razão de 1:3, ou seja, um terço do volume total corresponde ao inóculo.

Deixa-se repousar e são retiradas amostras diariamente para avaliar a sua evolução, com a medição do pH e da acidez total. Quando os valores de acidez estabilizam é obtido vinagre. Nesta fase a produção poderá continuar ou então terminar a fermentação, pasteuriza-se e embala-se para armazenar. Optando pelo primeiro caminho, faz-se uma adição.

Na inoculação foram utilizados como inóculo dois tipos diferentes de vinagre. Na primeira inoculação, ou seja a que corresponde aos ensaios exploratórios, foi feita com vinagre de vinho, que em termos de sabor se afasta um pouco daquilo que era pretendido.

Na segunda inoculação, ou seja, na que corresponde aos ensaios realizados o inóculo utilizado foi de outro fabricante e neste caso já se tratava de um vinagre de fruta, nomeadamente o vinagre de sidra. O que permite desde início uma maior aproximação às características organoléticas finais desejadas.

### **Adição**

Quando a fermentação acética já está a decorrer a adição de novo mosto é de 10% do volume total de fermentado, após a retirada desse mesmo volume de vinagre já pronto. O acompanhamento da fermentação mantém-se tal como antes até estabilize novamente.

### **Pasteurização e Embalamento**

Após a retirada do vinagre da barrica será novamente pasteurizado mais uma vez a 70°C durante 30 minutos para prevenir qualquer tipo de contaminação.

Depois do vinagre estar pronto e de acordo com a acidez total obtida no final da fermentação, este é diluído de modo que os valores de acidez total não ultrapassem o valor



da legislação. Da mesma forma o teor alcoólico também é determinado através de destilação e picnometria, para que também estes não ultrapassem os valores legislados para este parâmetro.

E por fim é embalado, tal como se pode verificar de seguida na figura 12.



Figura 12: Produto final, vinagre depois de embalado

### 2.3.1- Ensaios Exploratórios

- **Fermentação Acética 1 e 2 (Mel):**

A fermentação acética, como já foi referido realizou-se em barricas de madeira, pelo processo conhecido como tradicional. Nesta primeira fermentação o mosto utilizado foi o correspondente à fermentação alcoólica 2, sendo a barrica cheia com 4 L deste mosto e inoculada com 2 L de inóculo, isto é, vinagre não pasteurizado. O vinagre utilizado foi vinagre de vinho, visto que não havia vinagre de outros frutos disponível nesta altura.

Na “fermentação 2” correspondente à fermentação alcoólica do mel a barrica foi cheia com 4 L deste mosto e inoculada com 2 L de inóculo tal como a anterior, também o vinagre utilizado foi o vinagre de vinho, dado que ambas as fermentações se iniciaram na mesma altura, logo o inóculo utilizado foi o mesmo para ambas.

A fermentação foi acompanhada diariamente, com a medição do pH e da acidez total

### 2.3.2- Ensaios Realizados

Nesta fase, decorreram três fermentações acéticas em simultâneo correspondentes às fermentações alcoólicas efetuadas, mais uma vez ocorreram em barricas de madeira numa sala com temperatura controlada. A temperatura inicial da fermentação foi de 27°C, mas com o decorrer do tempo e também devido às elevadas temperaturas exteriores passou a ser de 25°C.

- **Fermentação Acética 3:**

Esta fermentação corresponde à fermentação alcoólica 3, ou seja o mosto utilizado na inoculação foi o resultante da fermentação alcoólica 3 (fermentação 1 e fermentação 2), logo foram usadas duas barricas (Acética 3.1 e Acética 3.2), para avaliar se com o seu desenvolvimento, haveria alguma interferência com o tipo de levedura utilizado.

O inóculo utilizado, neste caso já foi vinagre de fruta, mais precisamente vinagre de sidra não pasteurizado, o que por sua vez, já tem características mais próximas ao produto que se pretende obter no final.

À semelhança das fermentações anteriores a inoculação foi de 1:3, dois terços do volume com mosto e um terço de inóculo, num volume total de seis litros.

- **Fermentação Acética 4:**

Fermentação correspondente à fermentação alcoólica 4, ou seja o mosto utilizado na inoculação foi o resultante da fermentação alcoólica 3, mais especificamente à fermentação 4.2, (Acética 4.2), a correspondente à levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Também nesta o inóculo utilizado foi vinagre de sidra não pasteurizado.

À semelhança das fermentações anteriores a inoculação foi de 1:3, dois terços do volume com mosto e um terço de inóculo, mas neste caso o volume total foi de três litros.

### 2.4- Métodos Analíticos

Ao longo do trabalho tal com têm sido referidas, são efetuadas análises nas várias etapas do processo, como a medição de pH, a medição do °brix, o cálculo da acidez total e a medição do teor alcoólico.

Todas estas medições são relevantes para o acompanhamento e perceção do processo.

### 2.4.1- Medição do pH

O medidor de pH é um instrumento utilizado para medir a acidez ou a alcalinidade de uma solução, também chamada de pH. O pH é a unidade de medida que descreve o grau de acidez ou alcalinidade e é medido numa escala de 0 a 14. O valor de pH expressa o grau de acidez de um ácido ou de uma base em relação à atividade dos iões de hidrogénio.



Figura 13: Medidor de pH utilizado

Neste caso, a medição de pH foi feita com o medidor CONSORT C931, tal como mostra a figura anterior (figura 13). Este aparelho é constituído por um eléctrodo e um circuito potenciométrico, a leitura é feita em função da tensão que o eléctrodo gera quando submerso na amostra, a intensidade da tensão medida é convertida para uma escala de pH.

O aparelho tem de ser regularmente calibrado de acordo com valores de referência. Para a calibração são utilizadas soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

### 2.4.2- Medição do °Brix

O °Brix ou índice refratométrico é medido com um refratómetro, este mede o teor de sólidos solúveis totais (SST) que são na maioria açúcares.

O refratômetro utilizado na medição foi um refratômetro HANNA Instruments Inc. modelo HI 96801, como apresenta a figura 14:



Figura 14: Refratômetro utilizado

Em refratometria quando uma luz penetra num líquido ela muda de direção, o que chamamos de refração. O ângulo de refração é medido em graus e indica a mudança de direção do feixe de luz. Então, um refratômetro obtém e transforma os ângulos de refração em valores de índices de refração. A medida de índice de refração pode ser usada para determinar a concentração de uma solução, pois o índice de refração dela varia com a concentração.

O refratômetro é então um instrumento ótico utilizado para medir o índice de refração e relaciona com o valor da concentração de açúcar.

#### 2.4.3- Medição do Teor Alcoólico

- **Medição do teor alcoólico pela ferramenta online**

No caso da fermentação alcoólica o teor alcoólico foi medido com o auxílio de uma ferramenta online, ou seja, a ferramenta vinocalc, como mostra a figura 15.

**Monitor Ferment Progress with a Refractometer:**

Initial °Brix (refractometer)	<input type="text" value="18"/>
Current °Brix (refractometer)	<input type="text" value="16"/>
Initial Gravity	<input type="text" value="1.075"/>
Current Gravity (SG)	<input type="text" value="1.0581"/>
Current Gravity (°Brix hydrometer)	<input type="text" value="14.3"/>
True °Brix	<input type="text" value="15"/>
Residual Sugar (g/L)	<input type="text" value="159"/>
Current alcohol (%v/v)	<input type="text" value="2.1"/>

Figura 15: VinoCalc – ferramenta online para determinação do teor alcoólico residual

Fonte: (Musther, 2016)

Para utilizar a ferramenta basta colocar o °Brix inicial medido pelo refratômetro no campo “Initial °Brix (refractometer)” e o °Brix correspondente às várias leituras das amostras retiradas, no campo “Current °Brix (refractometer)”. Com estes dados é possível obter o valor de °Brix corrigido, no campo “True °Brix”, uma vez que o valor deste parâmetro medido no refratômetro é afetado pela presença de etanol, logo precisa de ser corrigido.

É também obtido o teor alcoólico no campo “Current alcohol (%v/v)”, que é o principal objetivo da utilização da ferramenta.

- **Medição do teor alcoólico residual por destilação e picnometria**

Em primeiro lugar é feita uma destilação, no entanto como o ácido acético pode alterar os valores reais de etanol durante a titulação, uma vez que a amostra é muito ácida, é feita uma correção do pH previamente. É utilizado hidróxido de sódio 1M para corrigir o pH para um pH neutro.

Depois deste procedimento segue-se então a destilação, onde é obtida uma mistura binária de água e etanol. Por fim é determinada a densidade do destilado alcoólico por picnometria.

A densidade em relação à água pura é uma ferramenta utilizada para determinar a % de álcool em soluções hidroalcoólicas, a uma dada temperatura. Pode ser medida por vários aparelhos, sendo os mais utilizados o picnómetro, o densímetro de leitura direta e o hidrômetro calibrado. Para este trabalho o aparelho utilizado foi o picnómetro.

O método com picnómetro consiste na medida da massa de um volume conhecido de líquido num recipiente denominado picnómetro. O mesmo é calibrado em relação à massa da água pura a 20°C. Da relação destas massas e volumes resulta a densidade relativa à água.

### **Procedimento**

Lavar o picnómetro, enxaguar com álcool e, posteriormente com éter. Deixar secar naturalmente e pesar. Encher o picnómetro com água a 20°C e pesar novamente. Lavar e secar o picnómetro e proceder da mesma forma com a amostra.

Depois deste procedimento, para determinar a densidade relativa é utilizada a seguinte equação:

$$\frac{m_{am} - m_p}{m_{H_2O} - m_p} = \text{Densidade relativa a } 20^\circ/20^\circ\text{C} \quad (1)$$

Onde,

$m_{am}$  - massa do picnómetro com a amostra

$m_p$  - massa do picnómetro vazio

$m_{H_2O}$  - massa do picnómetro com água

Com isto, obtém-se a graduação alcoólica do destilado alcoólico a 20°C. Para fazer a conversão da densidade em percentagem de álcool em volume é utilizada uma tabela de conversão (“% de álcool em volume a 20°C (%v/v) correspondente à densidade relativa”). O resultado final é expresso em % de álcool em volume (%v/v).

#### 2.4.4- Acidez Total

Em todas as amostras retiradas ao longo das fermentações acéticas foi necessário fazer titulações ácido-base, para determinar a acidez total de cada amostra e ao mesmo tempo acompanhar o desenvolvimento da fermentação, de modo a perceber quando esta terminava.

Nestas titulações foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH) 1M como titulante e como indicador ácido-base foi utilizado a fenolftaleína.

- **Procedimento**

Com uma pipeta volumétrica, foram pipetados rigorosamente, 10mL de amostra para um gobelé. Adiciona-se 3 a 4 gotas de fenolftaleína e a amostra é então titulada com NaOH 1M até atingir o ponto de viragem, ou seja, até ficar rosa carmim.

A partir do volume de titulante gasto é possível calcular o valor da acidez total. Para tal, utiliza-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(V_f - V_0) \times 0,6004}{V_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde,  $V_0$  e  $V_f$  correspondem respetivamente, ao volume inicial e final de titulante gasto em cada ensaio. E o fator 0,6004 é um valor determinado a partir da massa molar do ácido acético e do número de hidrogénios ionizáveis tendo em conta fatores de conversão que permitem que o resultado obtido seja em g de ácido acético/ 100mL.

##### 2.4.4.1- Exemplo de cálculo para a acidez total

Considerando a fermentação acética 1, no 38º dia, o volume inicial ( $V_0$ ) é 0 mL, o volume final ( $V_f$ ) são 14,6 mL e o volume da amostra ( $V_{\text{amostra}}$ ) é de 10 mL.

Então, substituindo na equação (2):

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(14,6 - 0) \times 0,6004}{10} \times 100 = 8,766$$

Obtém-se uma percentagem de acidez de 8,766.

Este cálculo foi idêntico para todas as amostras retiradas relativas à fermentação acética, apenas diferendo nos volumes inicial e final de cada uma delas.

## 2.5- Cálculos de Rendimento

Para avaliar de forma mais exata o desempenho das fermentações alcoólicas e acéticas foram feitos cálculos de rendimento de ambas. Para cada fermentação foram calculados: o rendimento em produto ( $Y_{P/S}$ ), a produtividade ( $Pr$ ) e o rendimento da fermentação ( $R$ ).

As equações utilizadas, são as que se encontram apresentadas de seguida:

- **Rendimento em produto**

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (3)$$

Onde, nas fermentações alcoólicas:

**$P_0$  e  $P_f$**  - concentração (g/L) inicial e final de etanol;

**$S_0$  e  $S_f$**  - concentração (g/L) inicial e final de sacarose.

Nas fermentações acéticas:

**$P_0$  e  $P_f$**  - concentração (g/L) inicial e final de ácido acético;

**$S_0$  e  $S_f$**  - concentração (g/L) inicial e final de etanol.



- **Produtividade**

$$Pr = \frac{P_{EXP}}{t} \quad (4)$$

Onde, nas fermentações alcoólicas:

$P_{EXP}$  - concentração (g/L) de etanol experimental.

Nas fermentações acéticas:

$P_{EXP}$  - concentração (g/L) de ácido acético experimental;

$t$  – tempo de fermentação em horas (h), para ambas as fermentações.

- **Rendimento da fermentação (%)**

$$R = \frac{P_{EXP}}{P_{TEO}} \times 100 \quad (5)$$

Onde, nas fermentações alcoólicas:

$P_{EXP}$  - concentração (g/L) de etanol experimental;

$P_{TEO}$  - concentração (g/L) de etanol máximo teórico.

Nas fermentações acéticas:

$P_{EXP}$  - concentração (g/L) de ácido acético experimental;

$P_{TEO}$  - concentração (g/L) de ácido acético máximo teórico.

### 2.5.1- Exemplo de cálculo para a fermentação alcoólica

Como exemplo de cálculo, vão ser utilizados os dados referentes à fermentação alcoólica 2 dos ensaios exploratórios. Os dados provenientes da fermentação necessários aos cálculos de rendimento são os apresentados na tabela seguinte (tabela 2):

Tabela 2: Dados retirados da fermentação alcoólica 2

	Inicial	Final
°Brix (g/100g)	18,5	1,9
% Etanol (mL/100mL)	0	9,9
Tempo de fermentação (h)	29	

- **Cálculo do rendimento em produto**

Para o cálculo do rendimento em produto utiliza-se a equação (3), anteriormente apresentada. Os valores de  $S_0$ ,  $S_f$  e  $P_0$ , são conhecidos,  $P_f$  tem de ser calculado através da densidade ( $d$ ) do etanol, em g/L. A densidade do etanol é de  $0,789\text{g/cm}^3$ .

Então,

$$m = P_f = 0,789 \times 99 = 78,11\text{g}$$

Isto significa que em cada litro de mosto, existem 78,11g de etanol. Ou seja,  $P_f=78,11\text{g/L}$ .

### **Cálculo da concentração inicial e final de sacarose**

Para este cálculo é necessário saber a densidade para o °Brix a que se está no início e no final da fermentação. Estes valores também eram fornecidos pela ferramenta online utilizada. Então com um °Brix inicial de 18,5 a densidade é de  $1,077\text{ g/cm}^3$ , e para o °Brix final de 1,9 a densidade é  $0,9942\text{ g/cm}^3$ .

Para a concentração inicial de sacarose com °Brix = 18,5:

$$V = \frac{1}{d} = \frac{1}{1,077} = 0,93\text{L}$$

$$S_0 = \frac{S_0}{V} = \frac{185}{0,93} = 199,45\text{ g/L}$$

Para a concentração final de sacarose com °Brix = 1,9:

$$V = \frac{1}{d} = \frac{1}{0,9942} = 1,01\text{L}$$

$$S_0 = \frac{S_0}{V} = \frac{19}{1,01} = 18,89 \text{ g/L}$$

Com os valores necessários em g/L, é só substituir na equação (3):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} = \frac{78,11 - 0}{199,245 - 18,89} = 0,43 \frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{g}_{\text{sacarose}}}$$

- **Cálculo da produtividade**

O cálculo da produtividade é feito com base na equação (4), onde a concentração do etanol experimental ( $P_{\text{EXP}}$ ) é a concentração final de etanol ( $P_f$ ), ou seja 78,11g/L. O tempo de fermentação ( $t$ ) foram 29h. Substituindo na equação (4):

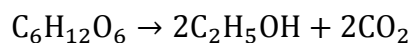
$$Pr = \frac{P_{\text{EXP}}}{t} = \frac{78,11}{29} = 2,6935 \frac{\text{g}}{\text{L} \cdot \text{h}}$$

- **Cálculo do rendimento da fermentação alcoólica**

O cálculo do rendimento da fermentação alcoólica é feito através da equação (5), onde mais uma vez ( $P_{\text{EXP}}$ ) corresponde à concentração final de etanol ( $P_f$ ) e ( $P_{\text{TEO}}$ ) um valor desconhecido que tem de ser calculado primeiro.

$$P_{\text{TEO}} = (S_0 - S_f) \times Y_t \quad (6)$$

O valor de  $Y_t$  é calculado a partir da razão das massas moleculares da glicose e do etanol, tendo em conta a equação da fermentação alcoólica:



Então,

$$Y_t = \frac{2 \times Me}{Mg}$$

Onde, Me é a massa molecular do etanol que é 46 g/mol e Mg a massa molecular da glicose que é 180 g/mol. Deste modo é possível calcular o valor de Yt:

$$Y_t = \frac{2 \times 46}{180} = 0,511$$

Substituindo na equação (5):

$$R = \frac{P_{EXP}}{P_{TEO}} \times 100 = \frac{78,11}{(199,245 - 18,89) \times 0,5111} \times 100 = 84,7545\%$$

### 2.5.2- Exemplo de cálculo para a fermentação acética

Como exemplo de cálculo, vão ser utilizados os dados referentes á fermentação acética 1 dos ensaios exploratórios. Os dados provenientes da fermentação necessários aos cálculos de rendimento estão apresentados na tabela 3:

Tabela 3: Dados retirados da fermentação acética 1

	Inicial	Final
% Ácido acético (g/mL)	0	8,65
% Etanol (mL/100mL)	9,9	0
Tempo de fermentação (h)	912	

- **Cálculo do rendimento em produto**

Para o cálculo do rendimento em produto utiliza-se a equação (3), anteriormente apresentada. Os valores de S<sub>f</sub>, P<sub>f</sub> e P<sub>0</sub>, são conhecidos, 0, 0 e 86,5, respetivamente. S<sub>0</sub> e S<sub>f</sub>

são calculados através da densidade (d) do etanol, em g/L. A densidade do etanol é de 0,789g/cm<sup>3</sup>.

Então,

$$m = S_0 = 0,789 \times 99 = 78,11\text{g}$$

Isto significa que em cada litro de mosto, existem 78,11g de etanol. Ou seja,  $S_0=78,11\text{g/L}$ .

Substituindo na equação (3):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} = \frac{78,11 - 0}{86,5 - 0} = 1,107 \frac{\text{g}_{\text{ácido acético}}}{\text{g}_{\text{etanol}}}$$

O rendimento em produto é de 1,107 g<sub>ácido acético</sub>/g<sub>etanol</sub>.

- **Cálculo da produtividade**

O cálculo da produtividade é feito com base na equação (4), onde a concentração do ácido acético experimental ( $P_{\text{EXP}}$ ) é a diferença entre as concentrações inicial e final de ácido acético. Sabendo que o tempo (t) é de 912h.

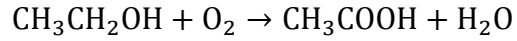
$$Pr = \frac{P_{\text{EXP}}}{t} = \frac{86,5 - 0}{912} = 0,095 \frac{\text{g}}{\text{L} \cdot \text{h}}$$

- **Cálculo do rendimento da fermentação alcoólica**

O cálculo do rendimento da fermentação acética é feito através da equação (5), onde mais uma vez ( $P_{\text{EXP}}$ ) corresponde á diferença entre as concentrações inicial e final de ácido acético e ( $P_{\text{TEO}}$ ) um valor calculado através do produto entre a quantidade de etanol consumida e o fator  $Y_t$ .

$$P_{\text{TEO}} = (S_0 - S_f) \times Y_t$$

O valor de  $Y_t$  é calculado a partir da razão das massas moleculares do ácido acético e do etanol, tendo em conta a equação da fermentação alcoólica:



Então,

$$Y_t = \frac{M_a}{M_g}$$

Onde,  $M_e$  é a massa molecular do etanol que é 46 g/mol e  $M_a$  a massa molecular do ácido acético que é 60 g/mol. Deste modo é possível calcular o rendimento teórico,  $Y_t$ :

$$Y_t = \frac{60}{46} = 1,3$$

Substituindo na equação (5):

$$R = \frac{P_{\text{EXP}}}{P_{\text{TEO}}} \times 100 = \frac{86,5 - 0}{(78,11 - 0) \times 1,3} \times 100 = 67,21\%$$

### 3- APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

#### 3.1- Ensaios Exploratórios

Como já foi referido anteriormente foram realizados ensaios exploratórios quer da fermentação alcoólica quer da fermentação acética. Estes ensaios tinham como principal objetivo perceber as condições em que se poderia trabalhar, dado que a laranja é um citrino e por vezes torna-se difícil produzir vinagre, dado que o ácido cítrico interfere com a fermentação acética.

##### 3.1.1- Fermentações Alcoólicas

##### Fermentação Alcoólica 1:

Tabela 4: Dados referentes à fermentação alcoólica 1

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	18,5	18,5	0
2,5	18,3	18,5	0
18,5	18,8	18,5	0
23,5	18,4	18,5	0
26,5	18,7	18,5	0
42,5	18,3	18,5	0
47,5	18,6	18,5	0
50,5	18,3	17,9	0,5
66,5	15,3	13,9	3,1
68,5	14,3	12,2	4
71,5	12,9	10,8	5,1
74,5	11	8,2	6,6
90,5	6,8	2,5	9,7
95,5	6,8	2,5	9,7
98,5	6,8	2,5	9,7
162,5	6,8	2,5	9,7
169	6,8	2,5	9,7

Nesta primeira fermentação é notório, o fato da fermentação ter sido inoculada uma segunda vez, pois demorou cerca de dois dias a começar a baixar o °Brix. A fermentação

terminou depois de 90,5h no entanto manteve-se mais algum tempo para ter a certeza que se continuava estável.

O gráfico que se segue mostra a variação dos °brix e da % de etanol em função do tempo:

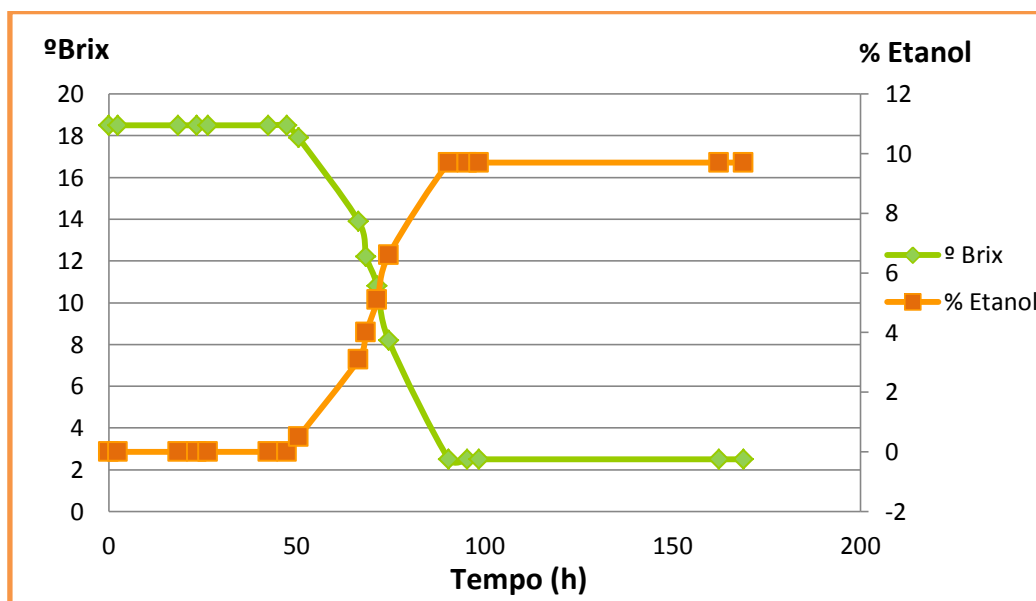


Figura 16: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 20.

## Fermentação Alcoólica 2:

Tabela 5: Dados referentes à fermentação alcoólica 1

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	18,5	18,1	0
2	17,5	16,8	1,2
3,5	17,5	16,8	1,2
6	17,3	16,6	1,4
21	7,3	3,2	9,3
25	6,2	1,7	10,1
26	6,2	1,7	10,1
29	6,4	1,9	9,9
46	6,4	1,9	9,9



Verifica-se pela tabela que após 29h a fermentação termina. Os valores finais são idênticos aos da fermentação anterior.

O gráfico que se segue mostra a variação dos °brix e da % de etanol em função do tempo:

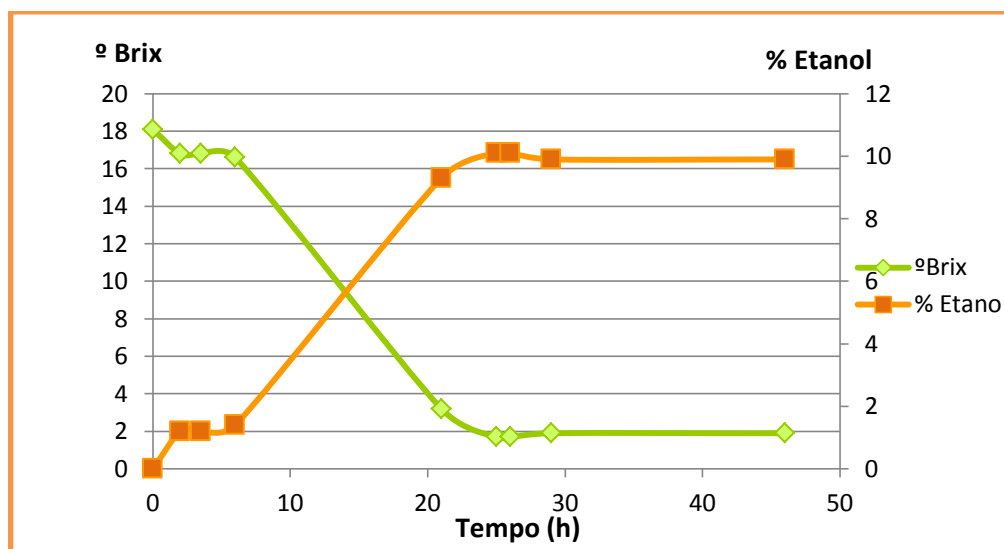


Figura 17: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 20.

### Fermentação Alcoólica Mel:

Tabela 6: Dados referentes à fermentação alcoólica mel

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	18,6	18,6	0
2	18,6	18,2	0,3
4	18,6	18,2	0,3
6	18,5	18,1	0,4
23	10,6	7,6	7
25	9,6	6,3	7,7
27	8,2	4,3	8,8
29	7,6	3,5	9,2
31	6,5	2	10
48	6,6	2,2	9,9

A fermentação alcoólica termina cerca de 31h horas depois e mais uma vez os valores finais são semelhantes aos das fermentações anteriores.

O gráfico que se segue mostra a variação dos °brix e da % de etanol em função do tempo:

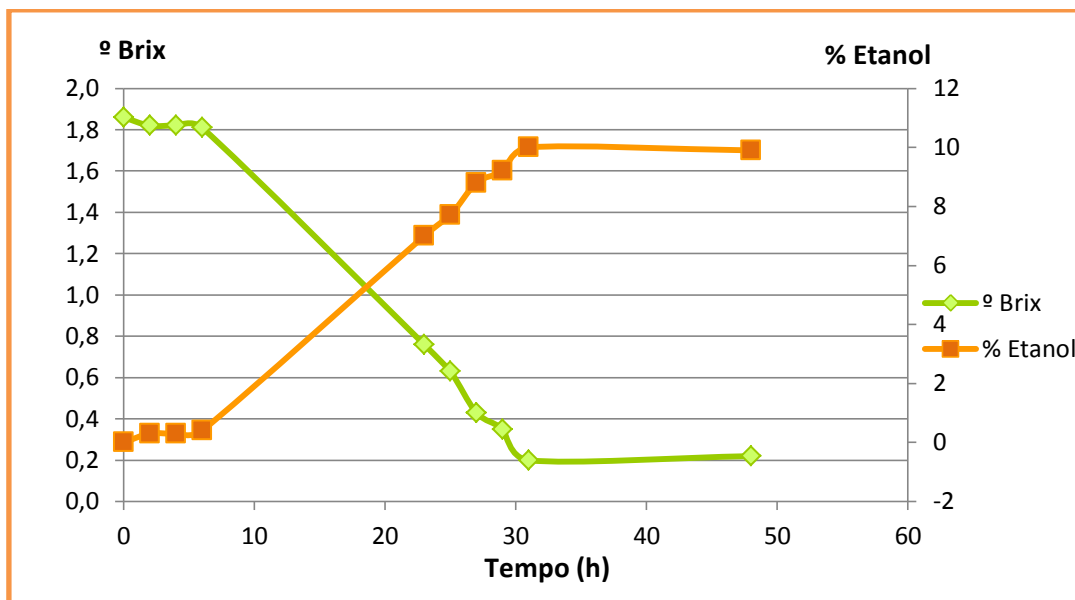


Figura 18: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica mel

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 20.

### 3.1.2- Fermentações Acéticas

#### Fermentação Acética 1:

Tabela 7: Dados referentes à fermentação acética 1

Dias	pH	Acidez
0	3,33	2,522
1	3,31	2,522
4	3,31	2,522
5	3,31	2,522
6	3,30	2,522
7	3,30	2,522
8	3,29	2,588
11	3,22	3,179
12	3,20	3,256
13	3,17	3,465
14	3,17	3,674
18	3,09	4,779
19	3,07	5,078
20	3,07	5,317
21	3,04	5,466
22	3,02	5,586
25	2,97	6,332
27	2,95	6,721
28	2,95	6,785
29	2,95	6,965
32	2,94	7,325
33	2,92	7,505
34	2,90	7,805
35	2,89	7,985
38	2,83	8,766
39	2,83	8,646
40	2,90	7,565
41	2,89	7,565
45	2,87	8,346
46	2,86	8,646
46	2,90	7,565
47	2,89	7,985
47	2,93	7,025
48	2,96	7,145
49	2,92	7,2048
52	2,90	7,98532
54	2,85	8,34556
55	2,85	8,4056

Nos dias assinalados a verde foi retirado vinagre já pronto e feitas adições de novo mosto, no primeiro dia de retirada, ou seja no 38º dia de fermentação acética foram retirados 500 mL de vinagre da barrica e adicionados 800 mL de mosto. Nos outros dois dias em que houve retirada e nova adição, foram retirados 500 mL de vinagre á semelhança do anterior e adicionados 600 mL, ou seja os 10% correspondentes ao volume total da barrica.

O gráfico que se segue mostra a variação do pH e da % de acidez em função do tempo:

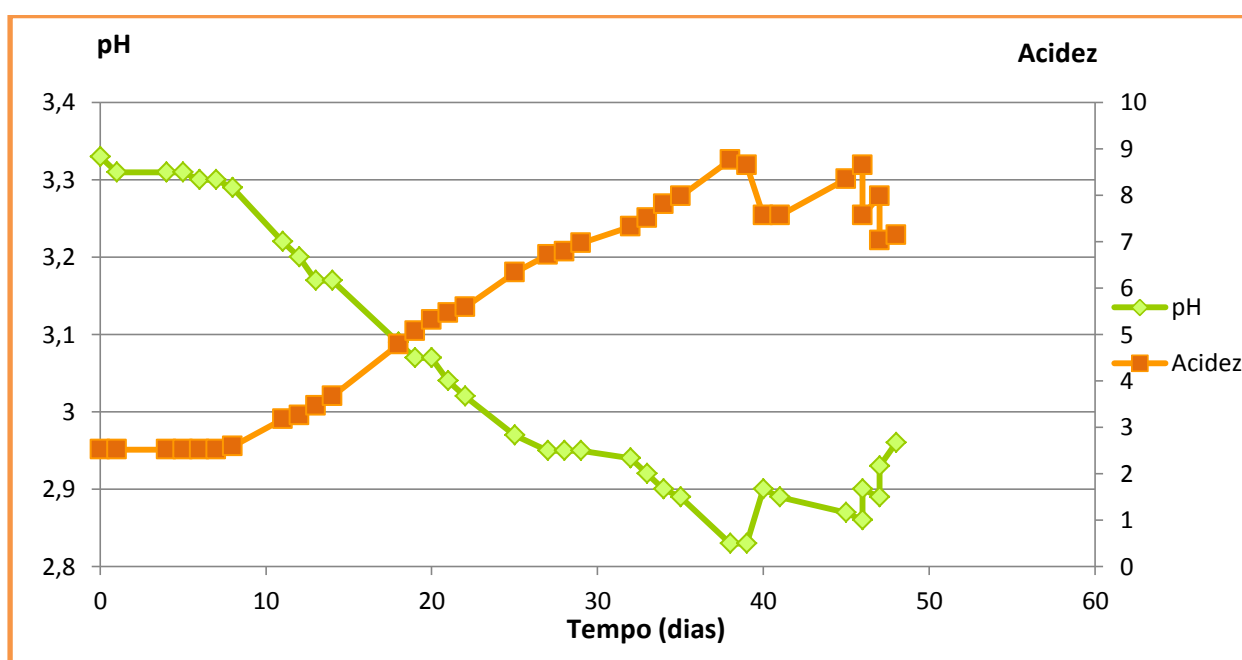


Figura 19: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respetivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 21.

**Fermentação Acética 2 (Mel):**

Os valores medidos diariamente para o pH e acidez encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: Dados referentes à fermentação acética 2 (Mel)

Dias	pH	Acidez
0	3,34	2,522
1	3,32	2,522
4	3,30	2,522
5	3,30	2,522
6	3,29	2,522
7	3,28	2,522
8	3,28	2,588
11	3,20	3,253
12	3,19	3,316
13	3,15	3,584
14	3,15	3,764
18	3,07	4,719
19	3,05	5,018
20	3,07	5,227
21	3,02	5,377
22	3,02	5,496
25	2,97	6,183
27	2,97	6,721
28	2,94	6,785
29	2,94	6,905
32	2,94	6,905

Nesta fermentação não houve novas adições de mosto. Foi retirado todo o vinagre produzido até à altura de uma só vez, pois foi contaminada.

O gráfico que se segue mostra a variação do pH e da % de acidez em função do tempo:

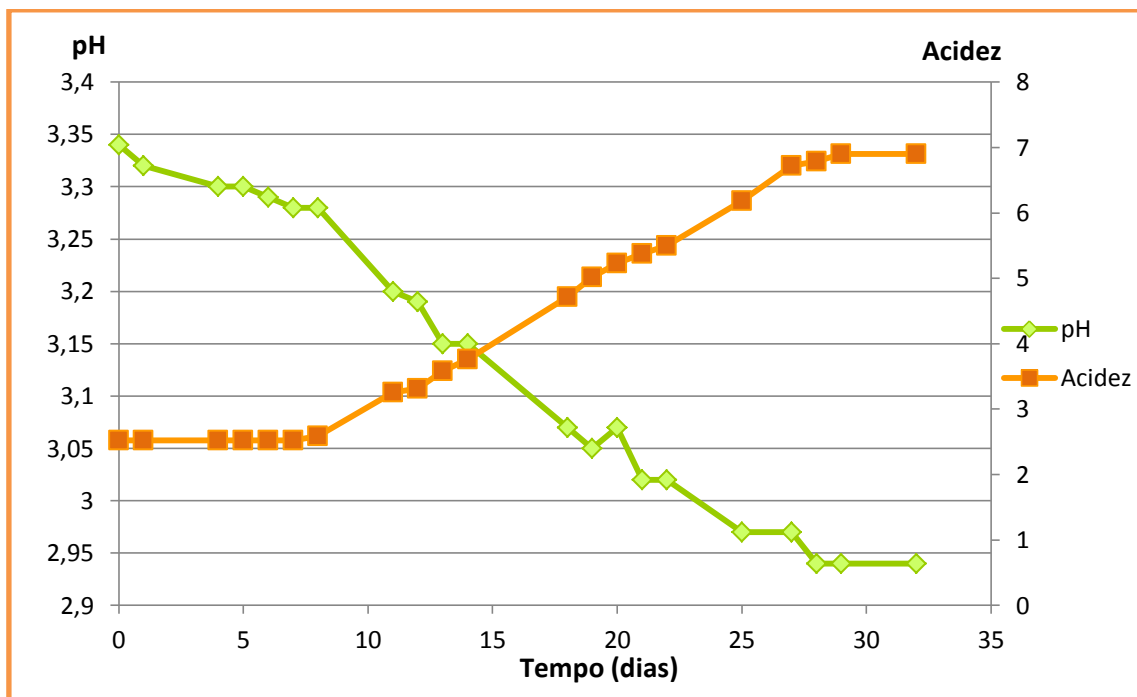


Figura 20: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 2 (MeI)

## 3.2- Ensaios Realizados

Estes ensaios já foram realizados com a laranja que se pretendia estudar e as condições adaptadas às das instalações nas quais o trabalho irá continuar a decorrer.

### 3.2.1- Fermentações Alcoólicas

#### Fermentação Alcoólica 3:

##### Fermentação 3.1:

A evolução do °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 9 e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 9: Dados referentes à fermentação alcoólica 3.1

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	16,7	16,3	0
2	16,7	16,3	0,3
18	16,0	15,4	0,9
21	14,7	13,7	2
24	13,3	11,9	3,2
26	11,5	9,5	4,7
42	7,0	3,5	8

Nota-se nas primeiras 18h a diminuição do °brix é lenta, correspondendo á fase de arranque da fermentação, no entanto vai ficando mais rápida, demorando apenas 42h até concluir.

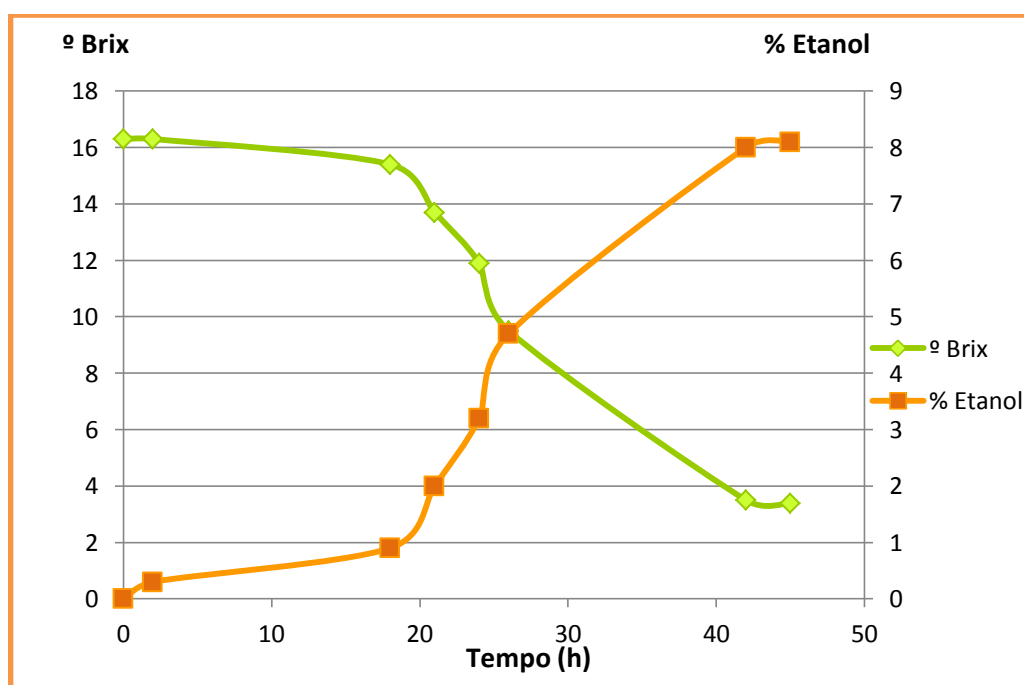


Figura 21: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 3.1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

### Fermentação 3.2:

Tabela 10: Dados referentes à fermentação alcoólica 3.2

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	16,7	16,3	0
6	16,7	16,3	0,3
22	14,1	13	2,5
25	11,7	9,8	4,5
28	10,1	7,7	5,7
30	8,4	5,4	7
46	6,5	2,8	8,4

Comparando com a fermentação anterior, dado que foram feitas ao mesmo tempo diferindo apenas na levedura, esta na “fase de arranque” é mais rápida que a anterior.

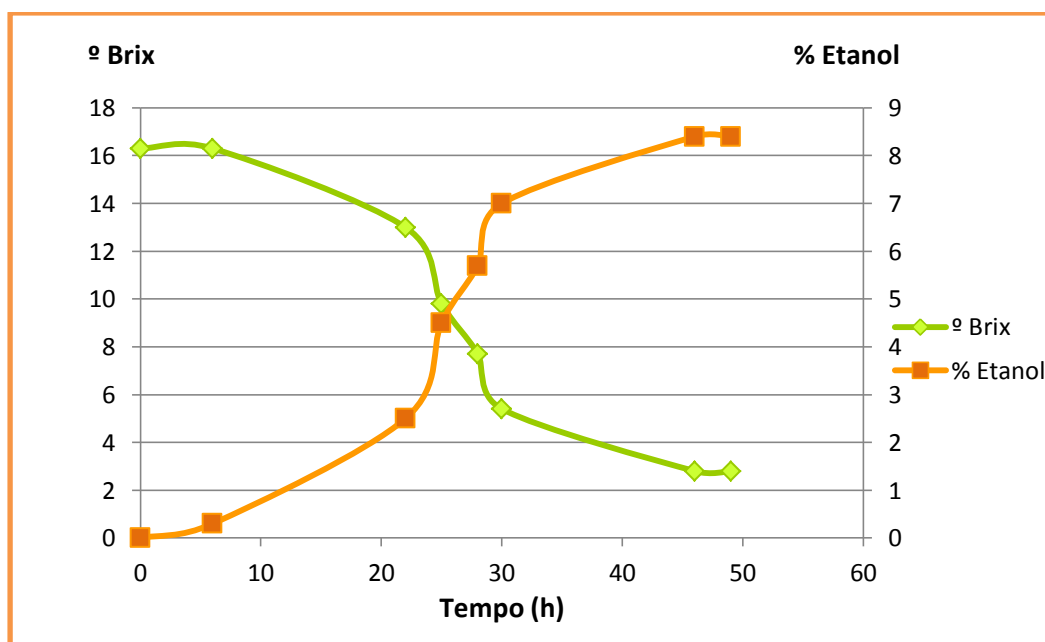


Figura 22: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 3.2



Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

#### **Fermentação Alcoólica 4:**

##### **Fermentação 4.1:**

A evolução do pH, dos °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 11, e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 11: Dados referentes à fermentação alcoólica 4.1

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	17,5	17,5	0
18,5	17,5	17,5	0
21	17,5	17,5	0
23	17,5	17,1	0,3
26	17,5	17,1	0,3
42,5	16,6	15,6	1,1
50	14,2	12,8	3,2
66,5	7,5	3,8	8,3
69	7,5	3,8	8,3

Neste caso, verifica-se que a “fase de arranque” é mais demorada que as fermentações anteriores, tal como o tempo de fermentação, que foi de 66,5 horas. Para esta fermentação a temperatura foi mais baixa, de apenas 23°C, o que pode influenciar o tempo que a mesma demora.

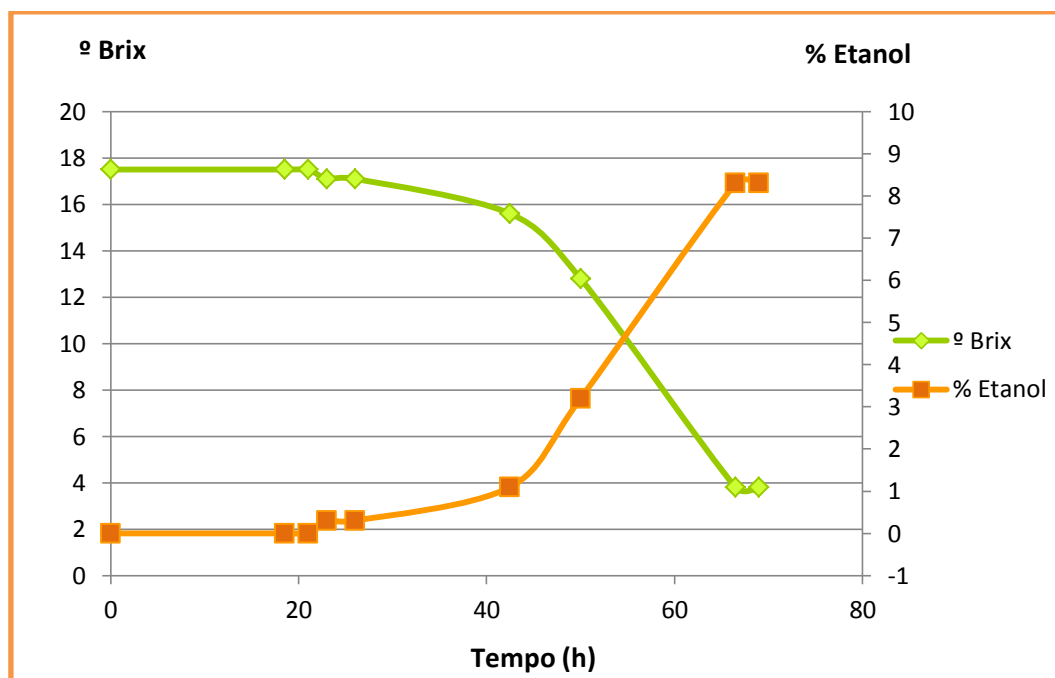


Figura 23: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 4.1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

#### Fermentação 4.2:

A evolução do °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 12, e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 12: Dados referentes à fermentação alcoólica 4.2

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	17,4	17,4	0
21	15,8	14,4	1,7
23,5	14,1	12,7	3,1
25,5	12,6	10,7	4,4
28,5	10,7	8,2	5,9
45	7,5	3,9	8,3
52,5	7,5	3,9	8,3

Ainda que, realizada nas mesmas condições, com a levedura *S. cerevisiae*, a fermentação foi mais rápida que a anterior. Sendo cerca de 8 horas mais rápida que a fermentação equivalente mas onde foi utilizada a levedura *S. bayanus*.

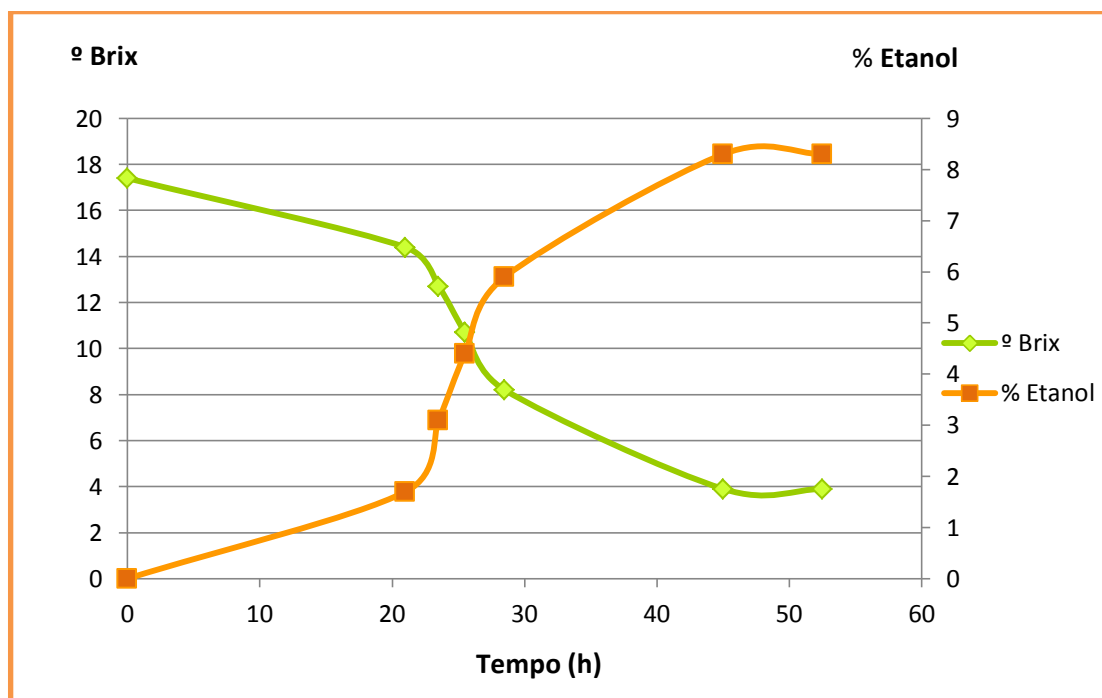


Figura 24: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 4.2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

## Fermentação Alcoólica 5:

### Fermentação 5.1:

A evolução do °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 13 e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 13: Dados referentes à fermentação alcoólica 5.1

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	19,1	19,1	0
3	19,1	18,7	0,3
19	14,2	12,3	4,6
22	11,7	8,9	6,6
24	10	6,6	7,9
27	8,4	4,4	9
43	7,9	3,7	9,4
46	7,9	3,7	9,4

Os dados obtidos para esta fermentação, são muito semelhantes ao obtidos para a fermentação 3.1 cujas condições são muito idênticas, aqui apenas varia o °Brix, que para esta ultima é mais elevado (19°Brix).

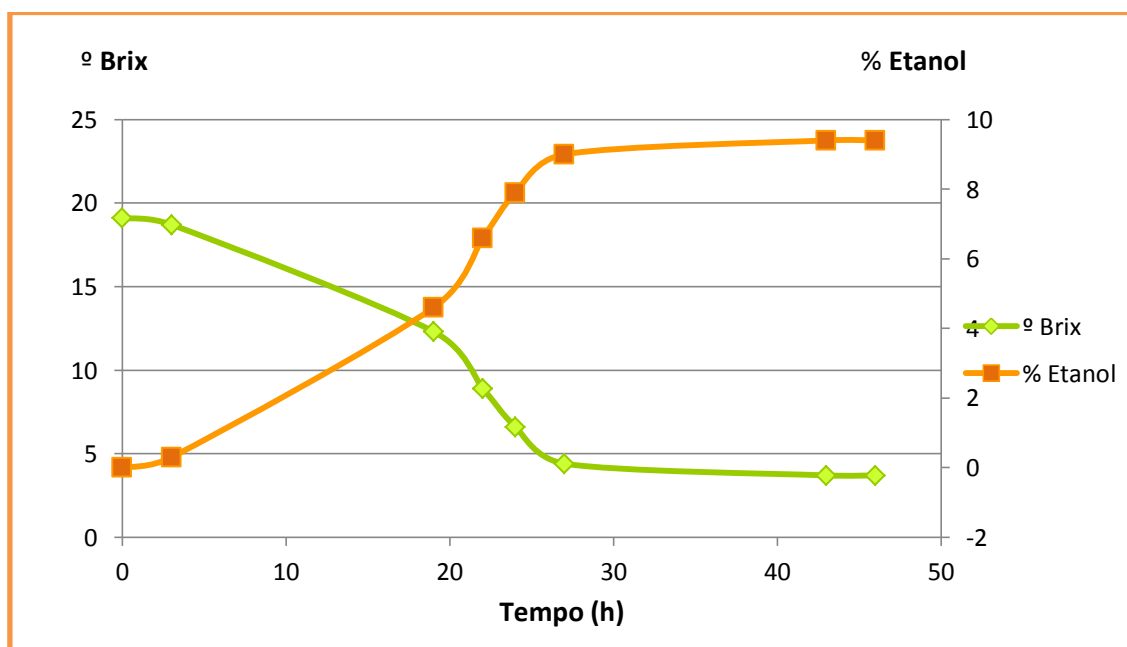


Figura 25: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 5.1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

### Fermentação 5.2:

A evolução do pH, dos °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 14, e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 14: Dados referentes à fermentação alcoólica 5.2

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	19,4	19,4	0
5,5	19,4	18,9	0,3
21,5	14,2	12,2	4,8
24,5	12,9	10,4	5,9
26,5	12	9,2	6,6
29,5	10,7	7,4	7,6
45,5	8	3,7	9,6
48,5	8	3,7	9,6

Apesar da levedura utilizada nesta fermentação ser a *S. cerevisiae* o tempo de fermentação foi semelhante á fermentação anterior.

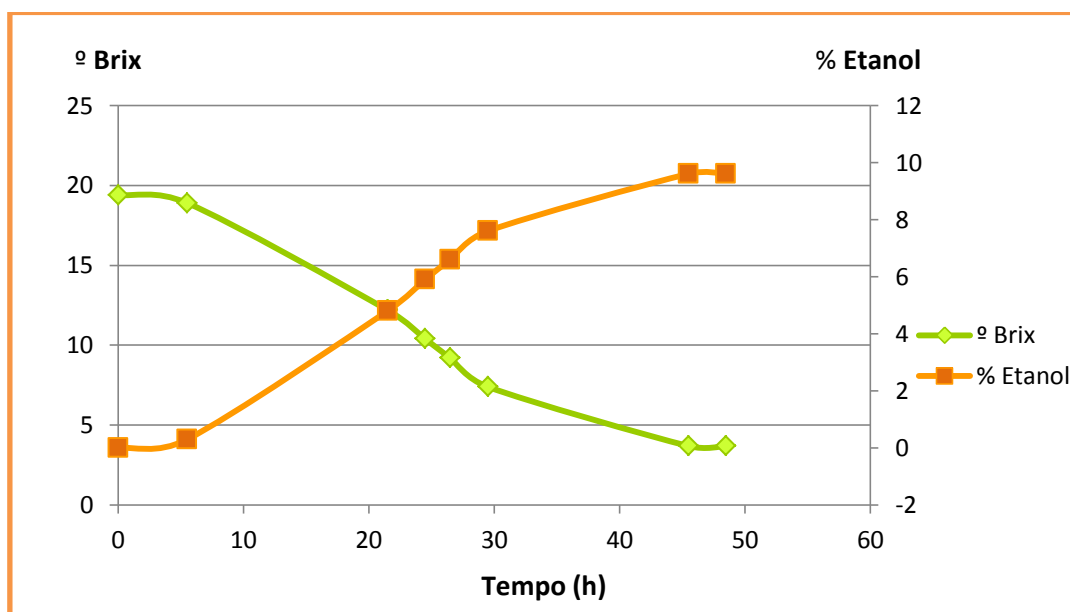


Figura 26: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 5.2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

## **Fermentação Alcoólica 6:**

### **Fermentação 6.1:**

A evolução do °Brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 15, e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 15: Dados referentes à fermentação alcoólica 6.1

<b>Tempo (h)</b>	<b>°Brix</b>	<b>°Brix real</b>	<b>%Etanol</b>
0	19,4	19,4	0
6	19,4	18,9	0,3
23	19,1	18,6	0,6
26	19,1	18,6	0,6
28	18,9	18,4	0,7
31	18,5	17,9	1,1
47	8,6	4,6	9,1
55	8	3,7	9,6

Também neste caso, a “fase de arranque” foi muito demorada, também nesta fermentação a temperatura foi mais baixa (23°C).

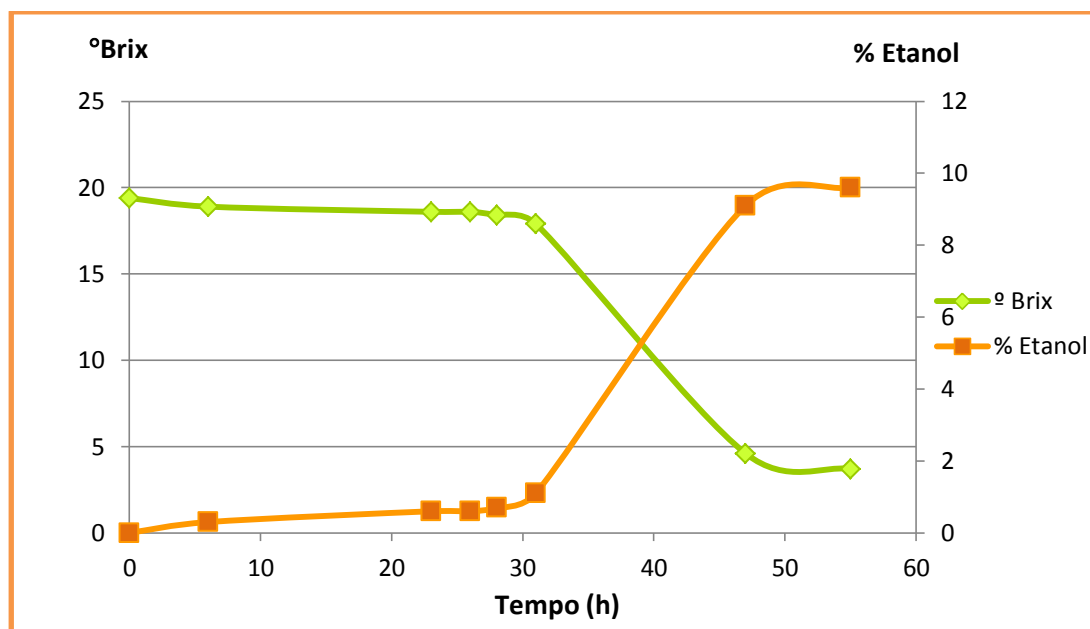


Figura 27: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 6.1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.

### Fermentação 6.2:

A evolução do °brix e da percentagem de etanol estão representados na tabela 16 e no gráfico correspondente logo de seguida.

Tabela 16: Dados referentes à fermentação alcoólica 6.2

Tempo (h)	°Brix	°Brix real	%Etanol
0	19,4	19,4	0
6	19,4	18,9	0,3
23	18,4	17,7	1,2
26	17,3	16,3	2,2
28	17,3	16,3	2,2
31	16	14,6	3,3
47	11,6	8,7	6,9
55	9,9	6,3	8,2
119	7,9	3,6	9,6

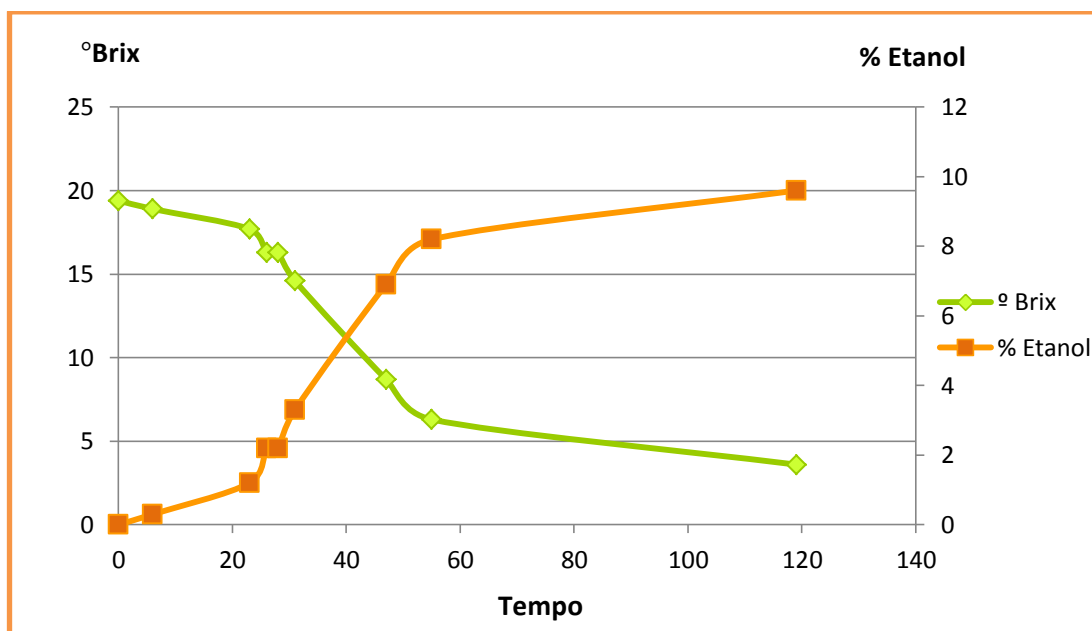


Figura 28: Variação do °Brix e da %etanol ao longo do tempo, referente à fermentação alcoólica 6.2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 22.



### 3.2.2- Fermentações Acéticas

- **Fermentação Acética 3:**

#### Acética 3.1:

A tabela 17 apresenta os resultados obtidos durante o acompanhamento da fermentação acética. Assim como o gráfico que permite uma melhor visualização da evolução da mesma.

Tabela 17: Dados referentes à fermentação acética 3.1

Dias	pH	Acidez
0	3,44	3,302
1	3,33	3,302
4	3,33	3,302
5	3,30	3,302
6	3,29	3,302
7	3,29	3,302
10	3,29	3,542
11	3,28	3,843
12	3,25	4,023
13	3,22	4,263
14	3,20	4,563
17	3,14	5,344
18	3,12	5,704
20	3,10	6,424
21	3,08	6,664
24	3,04	7,445
28	3,02	7,565
31	2,99	7,745
32	2,99	7,325
33	2,94	7,745
34	2,99	7,145
35	2,99	7,505
38	2,95	8,526
40	3,00	8,406
42	2,99	8,105
45	2,96	8,646
47	2,95	8,165
48	2,96	8,526
49	2,96	8,586
52	3,00	8,706
53	2,99	7,985
54	2,96	8,406
55	2,94	8,766

Ao longo da fermentação foram feitas adições de novo mosto á medida que era retirado vinagre já pronto, tal com antes as retiradas e adições foram de 10% do volume total, ou seja eram retirados 500 ml e adicionados 600 mL de mosto. Esta troca está assinalada na tabela, os dias correspondentes apresentam uma cor diferente.

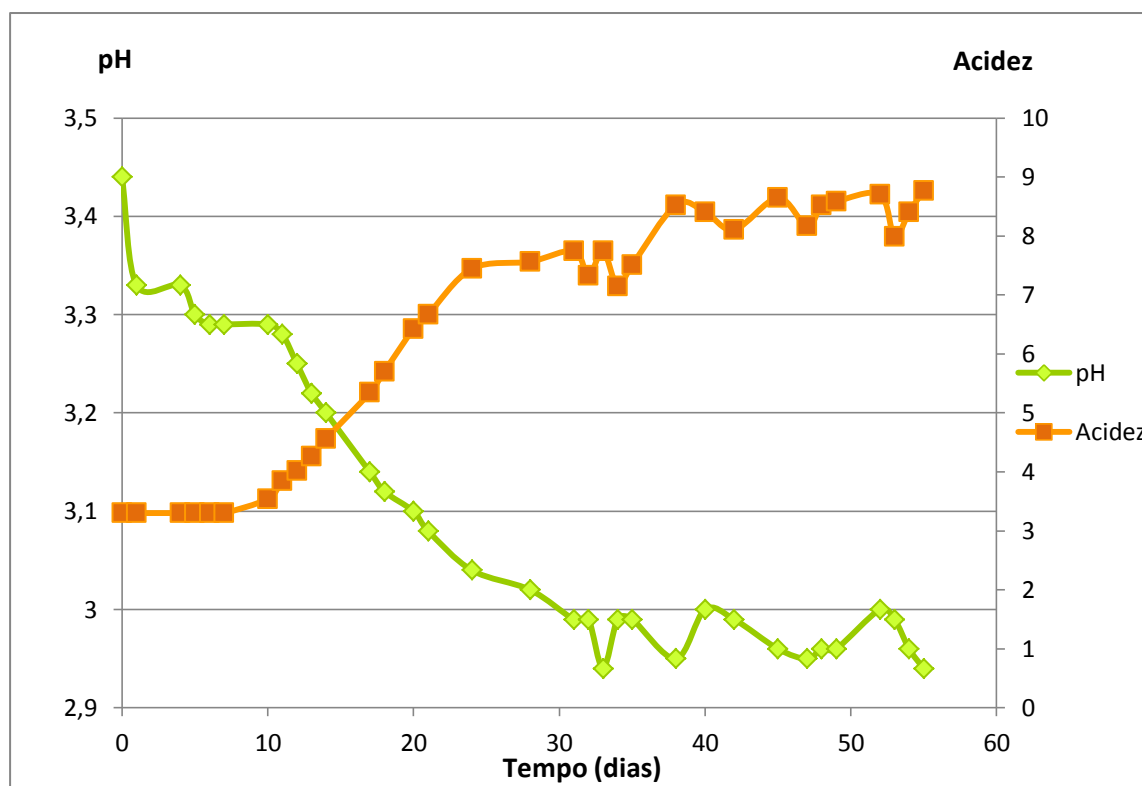


Figura 29: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 3.1

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 23.

### Acética 3.2:

A tabela 18 apresenta os resultados obtidos durante o acompanhamento da fermentação acética. Assim como o gráfico que permite uma melhor visualização da evolução da mesma.

Tabela 18: Dados referentes à fermentação acética 3.2

Dias	pH	Acidez
0	3,40	3,302
1	3,31	3,302
4	3,31	3,302
5	3,26	3,302
6	3,26	3,302
7	3,26	3,302
10	3,26	3,362
11	3,26	3,362
12	3,26	3,362
13	3,26	3,362
14	3,26	3,362
17	3,22	3,903
18	3,23	4,203
20	3,20	4,743
21	3,18	5,043
24	3,11	5,944
28	3,03	7,445
31	2,98	7,745
32	3,01	7,265
33	2,95	7,565
34	2,99	6,905
35	2,99	7,205
38	2,93	8,526
40	2,99	7,865
42	2,97	8,646
45	2,94	8,946
47	2,98	8,045
48	2,97	8,225
49	2,97	8,586
52	2,95	9,006
53	2,97	8,045
54	2,98	8,165
55	2,97	8,586

As adições não nem sempre eram equivalentes em todas as barricas, dependiam do desenvolvimento da fermentação mas á semelhança das anteriores correspondem a 10% do volume total, ou seja eram retirados 500 ml e adicionados 600 mL de mosto.

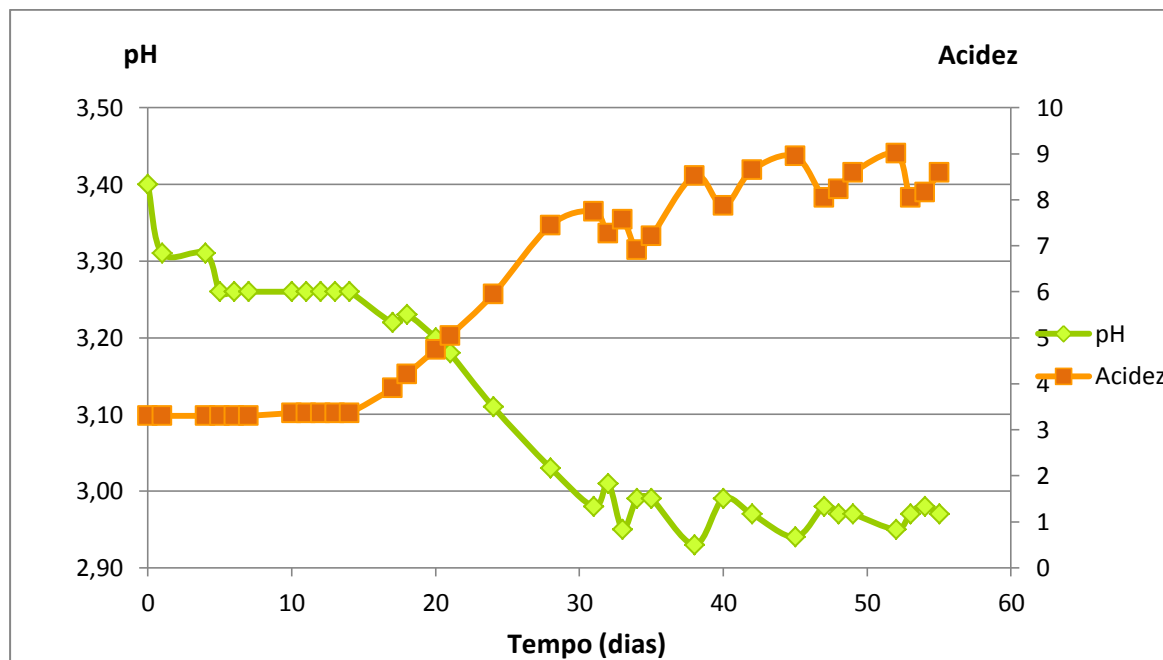


Figura 30: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 3.2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 23.

#### Fermentação Acética 4:

##### Acética 4.2:

A tabela 19 apresenta os resultados obtidos durante o acompanhamento da fermentação acética. Assim como o gráfico que permite uma melhor visualização da evolução da mesma.

Tabela 19: Dados referentes à fermentação acética 4.2

Dias	pH	Acidez
0	3,43	3,122
1	3,37	3,122
4	3,35	3,122
5	3,31	3,122
6	3,30	3,122
7	3,31	3,122
10	3,30	3,122
11	3,30	3,122
12	3,31	3,122
13	3,31	3,122
14	3,31	3,122
17	3,27	3,602
18	3,26	3,722
20	3,25	3,903
21	3,24	4,383
24	3,19	5,163
28	3,09	6,364
31	3,03	7,385
32	3,00	7,685
33	2,96	7,925
34	3,05	6,004
35	3,06	7,025
38	3,00	7,505
40	3,02	8,286
42	3,06	6,845
45	3,00	8,045
47	2,97	8,045
48	2,99	8,406
49	3,01	8,706
52	3,02	7,565
53	3,00	8,105
54	2,98	8,466
55	2,94	8,826

Neste caso, como o volume da barrica era menor, as retiradas eram apenas de 300 mL e adicionava-se igualmente os 600 mL, na tentativa de aumentar o volume da barrica.

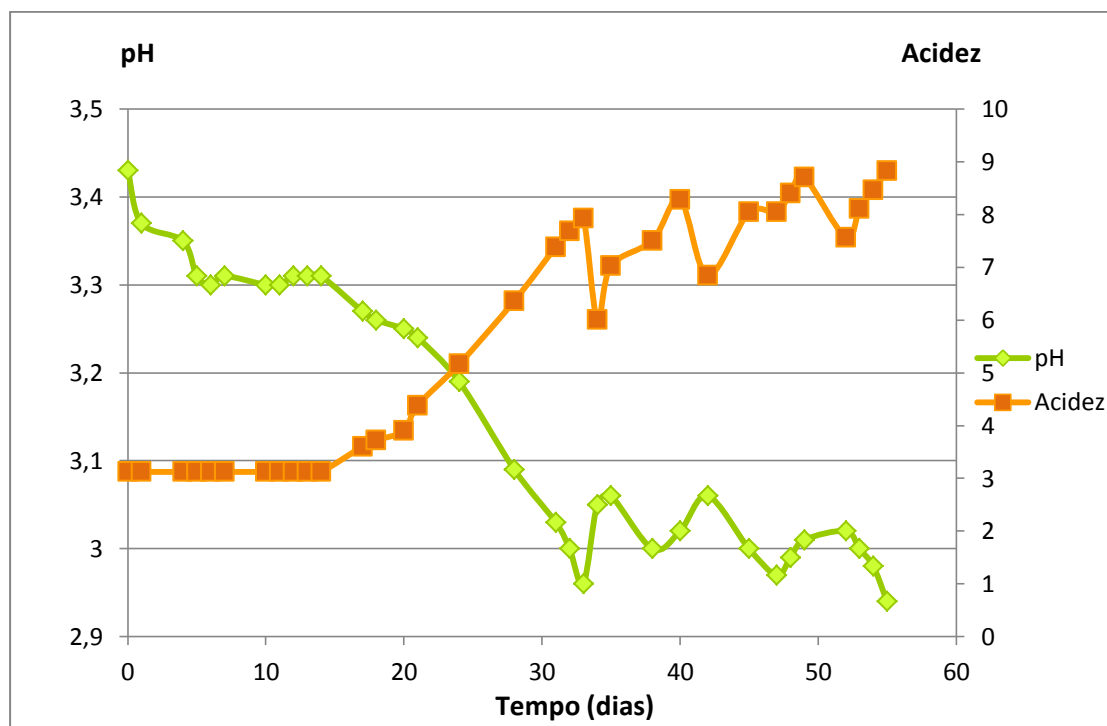


Figura 31: Variação do pH e da %acidez ao longo do tempo, referente à fermentação acética 4.2

Os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e os respectivos resultados encontram-se sintetizados na tabela 23.

## 4- DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 4.1- Ensaios Exploratórios

#### 4.1.1- Fermentações Alcoólicas

As primeiras fermentações alcoólicas realizadas, com a laranja *Newhall*, que não era a variedade que se pretendia estudar, mas permitiu analisar de que forma poderiam ser alteradas as condições ótimas de forma ao processo decorrer normalmente, mas adaptado às condições existentes na empresa.

A síntese dos resultados desta primeira abordagem exploratória encontra-se na tabela abaixo (tabela 20):

Tabela 20: Síntese dos resultados das fermentações alcoólicas referentes aos ensaios exploratórios

Fermentação	Levedura	Temperatura (°C)	Brix (inicial-final)	% Etanol Final	Tempo (h)	$Y_{P/S}$	Pr (g/L.h)	R (%)
Fermentação 1	<i>S.bayanus</i>	30	18,5-2,5	9,7	90,5	0,44	0,85	85,92
Fermentação 2	<i>S.bayanus</i>	30	18,5-1,9	9,9	29	0,43	2,69	84,75
Fermentação Mel	<i>S.bayanus</i>	30	18,6-2,2	9,9	31	0,44	2,52	85,67

A primeira fermentação alcoólica (fermentação 1) serviu para perceber como decorria a fermentação, logo de início verificou-se que demorou muito tempo a começar a fermentar, provavelmente devido a erros de cálculo referentes à preparação do inóculo, deste modo, teve de ser inoculada novamente.

O tempo de fermentação foi de 90,5h, mas ainda assim o rendimento em produto foi de 0,44 g<sub>etanol</sub>/g<sub>sacarose</sub>, a produtividade de 0,85g/L.h e o rendimento 85,92%.

Aqui a temperatura ainda estava dentro das condições ótimas, pretendia-se verificar se a levedura *S. bayanus* era viável para este estudo, o que se verificou.

Na fermentação alcoólica 2, as condições mantiveram-se (temperatura, grau brix e tipo de levedura), no entanto a fermentação não demorou tanto a começar e foi mais rápida, o tempo de fermentação foi de apenas 29h, o que se refletiu no valor da produtividade, mais significativo que o do ensaio anterior de 2,69 g/L.h. Já os valores de

rendimento em produto e rendimento da fermentação foram semelhantes aos da fermentação anterior,  $0,43 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$  e 84,75% respetivamente.

Para a fermentação alcoólica (Mel) tal como indicado, foi alterada a fonte de açúcar, que passou a ser o mel. Verificou-se que esta alteração não interferia com o desempenho da fermentação alcoólica, pois o rendimento em produto foi de  $0,44 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ , mais uma vez semelhante aos anteriores, a produtividade de  $2,52 \text{ g/L.h}$  e o rendimento de 85,67%. Ou seja valores muito idênticos aos obtidos nas fermentações anteriores que permitem avançar no sentido do produto desejado, isto é o vinagre de laranja e mel.

#### 4.1.2- Fermentações Acéticas

As primeiras fermentações acéticas foram feitas a partir das fermentações alcoólicas referentes aos ensaios exploratórios, também estas com o intuito de perceber como decorria a fermentação, se haveria diferenças nas fermentações quando eram alterados fatores como a fonte de açúcar, na fermentação alcoólica, entre outros.

Pretendia-se também verificar o tempo da fermentação e quais os possíveis problemas que se poderiam encontrar na realização desta fermentação.

A tabela 21 mostra uma síntese dos valores obtidos para cada uma das fermentações acéticas, realizadas nesta fase, assim como as condições em que as mesmas foram feitas.

Tabela 21: Síntese dos resultados das fermentações acéticas referentes aos ensaios exploratórios

Fermentação	Temperatura (°C)	pH (inicial-final)	%Acidez (inicial-final)	Tempo (h)	$Y_{P/S}$	Pr (g/L.h)	R (%)
Fermentação 1	27	3,33-2,83	2,52-8,77	912	1,107	0,095	67,21
Fermentação 2 Mel	27	3,34-2,94	2,52-6,91	768	-	-	-

Ambas as fermentações foram inoculadas no mesmo dia, sendo também o inóculo igual para ambas, neste caso foi utilizado vinagre de vinho não pasteurizado. As condições iniciais da fermentação eram iguais tal como referido no capítulo de materiais e métodos.



A fermentação acética 1 teve um período de aproximadamente 7 dias de adaptação até a fermentação começar e demorou 38 dias (912h) até atingir um valor de acidez próximo daquilo que se pretendia tendo em conta a percentagem de etanol presente no mosto utilizado, ou seja o mosto referente á fermentação alcoólica 2.

Os cálculos referentes ao rendimento em produto, à produtividade e ao rendimento da fermentação, são feitos apenas em relação á primeira tiragem de vinagre, pois o método não nos permite fazer cálculos de rendimento intermédios, dado que não nos é possível medir a % de etanol existente, como se está a trabalhar com um volume pequeno.

Relativamente aos rendimentos o valor que se afasta mais do que era esperado é o valor da produtividade, no qual se obteve um valor de 0,095 g/L.h, este valor mais baixo é explicável pelo elevado número de horas que a fermentação demorou até atingir o seu máximo.

A fermentação acética 2, cujo mosto utilizado foi o proveniente da fermentação alcoólica mel, não foi concluída, pois foi contaminada com o Nematode do vinagre (*Turbatrix aceti*), contaminação muito frequente nos vinagres.

Esta contaminação foi perceptível, pois os valores de pH e de acidez deixaram de baixar e aumentar, respetivamente e foi notória uma turbidez nas amostras devido a presença do nematode.

Como a fermentação teve de ser interrompida devido à contaminação, não foram feitos cálculos de rendimento, dado que esta não chegou ao fim.

Estes primeiros ensaios permitiram verificar como a fermentação acética decorria, no entanto a contaminação poderia vir da fruta, passa então a ser necessário um maior cuidado na preparação da matéria-prima e também a pasteurização do mosto, para certificar que não há contaminações.

## 4.2- Ensaios Realizados

### 4.2.1- Fermentações Alcoólicas

Os resultados obtidos nesta fase do trabalho baseiam-se num conjunto de dados obtidos a partir de oito fermentações alcoólicas, os resultados das mesmas estão representados de forma sintetizada na tabela que se segue (tabela 22) para melhor compreensão dos mesmos.

Tabela 22: Síntese dos resultados das fermentações alcoólicas referentes aos ensaios realizados

Fermentação	Levedura	Temperatura (°C)	Brix (inicial-final)	% Etanol Final	Tempo (h)	Y <sub>P/S</sub>	Pr (g/L.h)	R (%)
Alcoólica 3.1	<i>S.bayanus</i>	27	16,7-3,4	8,1	45	0,44	1,42	86,5
Alcoólica 3.2	<i>S. cerevisiae</i>	27	16,7-2,8	8,4	45	0,44	1,44	86,1
Alcoólica 4.1	<i>S.bayanus</i>	23	17,4-3,8	8,3	66,5	0,43	0,99	85,7
Alcoólica 4.2	<i>S. cerevisiae</i>	23	17,4-3,9	8,3	45	0,44	1,46	86,9
Alcoólica 5.1	<i>S.bayanus</i>	27	19,1-3,7	9,4	43	0,43	1,73	85,8
Alcoólica 5.2	<i>S. cerevisiae</i>	27	19,1-3,7	9,6	45,5	0,43	1,67	85,8
Alcoólica 6.1	<i>S.bayanus</i>	23	19,4-3,7	9,6	55	0,43	1,38	85,8
Alcoólica 6.2	<i>S. cerevisiae</i>	23	19,4-3,7	9,6	70	0,43	1,08	85,3

De forma muito geral é possível afirmar que a variação dos três fatores em estudo (° Brix, tipo de levedura e temperatura) não influencia de forma significativa a fermentação alcoólica, pois há grandes discrepâncias entre os valores de rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, entre as várias fermentações. E também não condicionam a fermentação, pois em todas as situações esta decorre com maior ou menor velocidade até terminar.

Para cada fermentação é apresentado um gráfico do ° Brix em função do pH, na apresentação de resultados, que permite visualizar o aumento da concentração de etanol produzido pelas leveduras e consequente diminuição do °Brix, dado que estas consomem o açúcar presente no meio.

Ao avaliar o efeito do tipo de levedura no desenvolvimento da fermentação alcoólica, verifica-se que onde há mais oscilação é no tempo de fermentação.

Tanto a *S. cerevisiae* como a *S. bayanus* para condições idênticas apresentam valores de  $Y_{P/S}$ , Pr e R, muito próximos.

Seria de esperar que a *S. cerevisiae* apresenta-se um melhor desempenho, dado que a *S. bayanus* não se adapta com muita facilidade a meios mais ácidos. No entanto, verificou-se que a utilização de ambas é viável, dentro dos padrões pretendidos.

Contudo, dado que se pretende chegar ao melhor método, a levedura mais aconselhável é a *S. cerevisiae*, atendendo às temperaturas do processo e ao tempo de fermentação, esta é mais rápida a temperaturas mais baixas.

Isto, torna-se mais evidente no início da fermentação, mesmo que depois os tempos totais da fermentação sejam idênticos, a temperaturas mais baixas a *S. cerevisiae* fermenta mais rápido.

Relativamente á temperatura, mais uma vez verifica-se que a nível de rendimento da fermentação não há grandes diferenças. Nesta situação o que se pretendia era analisar se a temperaturas menos favoráveis a fermentação ocorreria normalmente.

O que realmente se comprovou, pois mesmo a temperaturas de 23°C o rendimento em produto, a produtividade e o rendimento da fermentação mantiveram valores muito próximos, novamente onde as diferenças são mais notórias em função da temperatura é no tempo de fermentação.

Na fermentação alcoólica 6, foi onde se notou os tempos mais elevados, a 6.1 durou 55h e a fermentação 6.2 70h, enquanto a temperaturas mais elevadas, ronda as 45h aproximadamente.

Outro fato relevante na fermentação 6 foi a levedura *S. cerevisiae* demorar muito mais tempo que a *S. bayanus* a terminar a fermentação, mas tal como já se tinha evidenciado no início foi mais rápida que esta segunda.

O °Brix, outro dos fatores analisado durante o estudo em questão, à semelhança do que já foi dito anteriormente, no que diz respeito ao rendimento em produto e ao rendimento da fermentação, não é um fator condicionante, os valores são idênticos em todas as fermentações.

Neste caso, a produtividade destacou-se em relação aos casos anteriores, ou seja, com um Brix mais elevado (19,1°Brix) e também uma temperatura mais elevada (27°C) a produtividade é mais alta. Isto verifica-se na fermentação alcoólica, onde a produtividade da fermentação 5.1 foi de 1,73 g/L.h e na fermentação 5.2 foi de 1,67 g/L.h.

O que não significa que maiores quantidades de açúcar leve a uma melhor produtividade, dado que na fermentação 6 com o mesmo grau Brix mas com uma temperatura mais baixa (23°C) os valores da produtividade também baixam.

Contudo, é também visível que a percentagem de etanol produzida é maior quando o °Brix é mais elevado. O que se justifica pelo fato de haver maior produção de etanol por parte das leveduras, dado que há mais substrato no meio para estas se alimentarem.

Comparando com resultados também referentes a fermentações alcoólicas de sumo de laranja, obteve-se, para uma temperatura de 28°C um tempo de fermentação de 48h. Em fermentações cujo °Brix varia entre 18 e 22°Brix, tendo sido obtidos rendimentos da fermentação entre 70 a 72% (Tessaro *et al*, 2010).

O rendimento em produto também varia entre 0,25 e 0,28 g/L.h (Tessaro *et al*, 2010). Logo, verifica-se que as fermentações realizadas obtiveram resultados melhores que o que seria esperado, pois os rendimentos em produto e rendimento, da fermentação apresentam valores um pouco mais elevados que estes. Mesmo quando foram utilizadas temperaturas mais baixas.

#### **4.2.2- Fermentações Acéticas**

As fermentações acéticas referentes aos ensaios realizados, tal como já foi referido anteriormente, foram feitas a partir de mosto proveniente das fermentações alcoólicas dos ensaios realizados.

A fermentação acética 3.1 iniciou-se com mosto proveniente da fermentação alcoólica 3.1, a fermentação acética 3.2 com mosto da fermentação alcoólica 3.2 e a 4.2 foi de encontro às duas anteriores. Neste caso foi utilizado mais do que um mosto de uma fermentação alcoólica, para a realimentação das barricas, no entanto foi sempre com o mesmo tipo de levedura para cada uma das barricas.

Para estas fermentações, o inóculo foi diferente das anteriores, aqui foi utilizado vinagre não pasteurizado de sidra, que por sua vez já é um vinagre mais doce que o utilizado nas fermentações anteriores.

A tabela 23 mostra a síntese dos valores obtidos em termos de rendimento e também algumas das condições iniciais e finais a que decorreram as fermentações, para que se possa compreender melhor cada uma delas.

Tabela 23: Síntese dos resultados das fermentações acéticas referentes aos ensaios realizados

Fermentação	Temperatura (°C)	pH (inicial-final)	%Acidez (inicial-final)	Tempo (h)	$Y_{P/S}$	Pr (g/L.h)	R (%)
Fermentação 3.1	27	3,44-3,08	3,30-6,66	504	1,042	0,132	63,25
Fermentação 3.2	27	3,40-3,18	3,30-5,04	504	0,760	0,100	46,15
Fermentação 4.2	27	3,43-2,96	3,12-7,93	792	1,21	0,100	73,49

Ao comparar com os resultados obtidos na primeira fermentação referente aos ensaios exploratórios, verifica-se que em termos rendimento em produto, produtividade e rendimento da fermentação, os valores obtidos são idênticos. Com exceção da fermentação acética 3.2, que apresenta valores um pouco mais baixos.

No caso das fermentações 3.1 e 3.2, a primeira tiragem de vinagre foi feita com valores de acidez ainda muito baixos quando comparados com os de tiragens seguintes ou mesmo da fermentação 4.2. Isto deve-se ao fato de não haver a certeza de quando o etanol se esgotaria, como não se pretendia que a fermentação parasse não se deixava chegar a valores muito elevados de acidez. Por exemplo, a nível industrial, com maior volume disponível, é possível fazer a medição do etanol para evitar este tipo de situações.

A fermentação acética 4.2 foi mais lenta que as outras, é importante referir que esta tinha um volume mais pequeno que a 3.1 e 3.2. No entanto em termos de rendimento em produto e rendimento da fermentação foi a que apresentou melhores resultados  $1,21 \text{ g}_{\text{ácido}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  e 73,49% respetivamente.

Comparando também com resultados de fermentações acéticas feitas a partir de mosto proveniente da fermentação alcoólica de sumo de laranja, verificou-se que a percentagem final de acidez variava entre 5,20 e 9,60 %, sendo as percentagens de etanol inicial de 12 a 14% (Tessaro *et al*, 2010), ou seja também aqui se verifica que as fermentações acéticas realizadas obtiveram rendimentos acima destas, pois para uma percentagem de etanol mais baixa, os valores finais de acidez foram idênticos.

Relativamente à qualidade final dos vinagres é importante referir que para os três casos se obteve um vinagre isento de contaminações, límpido, com uma cor adequada tendo em conta a presença do mel. Mas entre os três também há diferenças o vinagre 3.1

apresenta uma cor mais clara que o 3.2, e por sua vez este também é mais claro que o vinagre 4.2.

Em termos de sabor todos os vinagres foram avaliados pela empresa, verificando-se que as amostras resultantes dos ensaios experimentais tinham um perfil mais próximo do pretendido que as resultantes dos ensaios exploratórios.

No entanto, mais uma vez há grandes diferenças entre eles, o vinagre resultante da fermentação acética 3.1 é o que menos se aproxima do produto final pretendido é mais ácido e não é tão doce como os outros. O 3.2 já é mais suave, mais adocicado, nota-se mais a presença do mel e não só da laranja. Contudo o vinagre resultante da fermentação acética 4.2 está de acordo com as características finais pedidas para o produto, quer a nível de aspeto quer de sabor.

Ainda que todas tenham sido realizadas nas mesmas condições os produtos finais são diferentes, isto pode ser explicado pelo fato das culturas bacterianas existentes em cada uma das fermentações não serem as mesmas. Para confirmar tal hipótese, em trabalhos futuros, há a necessidade de fazer análises microbiológicas às amostras para verificar quais as culturas presentes.

A fermentação acética 4.2, após as barricas serem todas totalmente despejadas, foi a única na qual se verificou a existência da camada fina gelatinosa chamada “mãe do vinagre”, o que mais uma vez, pode ser explicado pelas diferentes culturas de bactérias existentes na fermentação.

## 5- CONCLUSÃO

Este trabalho, tal como foi referido inicialmente e ao longo do trabalho, teve como principal objetivo, desenvolver um processo fermentativo que permitisse produzir vinagre de laranja e mel, em condições menos favoráveis. Ou seja temperaturas mais baixas, um processo maioritariamente tradicional quer na fermentação alcoólica quer na acética.

Após concluídos os ensaios necessários verificou-se que seria possível ocorrer o processo a temperaturas de 23°C. A fermentação alcoólica é possível a esta temperatura sendo recomendada a utilização da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, dado que esta quando utilizada a temperaturas mais baixas é mais rápida.

Também foi testada a levedura *Sacharomyces bayanus*, que também apresenta bons resultados, principalmente a temperaturas mais altas, no entanto a temperaturas mais baixas torna-se mais lenta na fase inicial da fermentação.

Relativamente ao °Brix também se verificou que não interferia diretamente com a fermentação alcoólica, os rendimentos para °Brix de 17 foram muito idênticos aos rendimentos obtidos para um °Brix de 19. Este fator interfere mais diretamente com o produto final, ou seja com o vinagre, que poderá ser mais ou menos adocicado tendo em conta o mosto utilizado.

As fermentações acéticas também decorreram a temperaturas ambiente, entre os 25 e 27°C, sendo feitas tiragens frequentes de vinagre, com posterior adição de mosto, decorreram com normalidade, sendo atingidos valores de acidez e de rendimento, acima do inicialmente previsto.

Os vinagres obtidos estão de acordo com as características pretendidas, mais uma vez é de salientar que o vinagre proveniente da fermentação acética 4.2 é o produto que reúne todos os atributos a que se pretendia chegar inicialmente.

Como trabalho futuro sugere-se o desenvolvimento de um método que permita calcular a percentagem de etanol presente quando é feita uma nova adição de mosto após a retirada de vinagre já pronto. Para que se possa saber o rendimento intermédio da fermentação. Sugere-se também um estudo microbiológico das culturas de bactérias existentes em cada amostra de mosto diferente, pois é a partir desta que vêm as diferentes características finais dos vinagres e da existência visível da camada gelatinosa “mãe do vinagre”.





## 6- REFERÊNCIAS

Alcitrus. (nd). *Laranjas*. Obtido em 15 de fevereiro de 2017, de [http://www.alcitrus.pt/site/?page\\_id=681](http://www.alcitrus.pt/site/?page_id=681)

Alvarenga, L. M. (2014). *Fermentados Alcoólico e Ácético de Polpa e Casca de Abacaxi I(Ananas comosus (L.) Merrill): Cinética das Fermentações e Caraterização dos Produtos*. Belo Horizonte: Universidade federal de Minas Gerais. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-9VCM6W/tese\\_\\_let\\_cia\\_\\_novembro\\_2014.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-9VCM6W/tese__let_cia__novembro_2014.pdf?sequence=1)

Corazza, M. L., Rodrigues, D. G., & Nozaki, J. (27 de novembro de 2001). Preparação e Caraterização do Vinho de Laranja. *Química Nova*, 24, 449-452. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de <http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n4/a04v24n4.pdf>

Frustock. (sd). *As Vairedades de Laranja*. Obtido em 17 de outubro de 2017, de <http://www.frustock.pt/gca/?id=39>

Gomes, C. C., Pombo, J., & Pina, K. (2013). *Produção de Vinagre*. Obtido em 15 de fevereiro de 2017, de [http://www.ebah.pt/content/ABAAAg\\_DoAG/producao-vinagre](http://www.ebah.pt/content/ABAAAg_DoAG/producao-vinagre)

Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. In E. A. Johnson, & C. Echavarri-Erasun, *The Yeasts* (5ª edição ed., Vol. 1, pp. 21-44). Obtido em 20 de Outubro de 2017, de *Saccharomyces Cerevisiae*: <http://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/saccharomyces-cerevisiae>

Labnetwork. (16 de dezembro de 2016). *Enzima da levedura do pão mostra potencial contra células de leucemia linfoide aguda*. Obtido em 22 de Outubro de 2017, de <http://www.labnetwork.com.br/noticias/enzima-da-levedura-do-pao-mostra-potencial-contra-celulas-de-leucemia-linfoide-aguda/>

*Laranja - Importância Económica*. (15 de maio de 2011). Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de <http://laranjaeconomia.blogspot.pt/>

Lima, R. (30 de maio de 2014). *Fermentação e processos enzimáticos*. Obtido em 14 de setembro de 2017, de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgIQAE/fermentacao-processos-enzimaticos>

Mongelo, A. I. (julho de 2012). *Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras*. Campo Grande Mato Grosso do Sul: Universidade Católica Dom Bosco. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de <http://www.gpec.ucdb.br/pistori/orientacoes/dissertacoes/arnaldo2012.pdf>

Musther, J. (dezembro de 2016). *VinoCalc*. Obtido de <http://www.musther.net/vinocalc.html>

Omaiaa. (2011). *O Mercado da Laranja em Portugal*. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de Observatorio dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares: [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=129](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=129)

Pinheiro, J. (3 de janeiro de 2011). *Verde Horizonte on-line*. Obtido em 17 de Outubro de 2017, de <https://online.verdehorizonte.net/2011/01/03/visita-de-estudo-a-microsoft-e-a-tagusvalley/>

Rizzon, L. A., & Meneguzzo, J. (setembro de 2002). *Sistema de Produção de Vinagre*. Obtido em 13 de fevereiro de 2017, de <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/26037/1/Doc36.pdf>

Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Genomes of model organisms. In N. Saraswathy, & P. Ramalingam, *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (pp. 29-48). Woodhead Publishing. Obtido em 20 de Outubro de 2017, de Genomas de organismos modelo: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9781907568107>

Schmoeller, R. K., & Balbi, M. E. (dezembro de 2010). Caracterização e Controle de Qualidade de Vinagres Comercializados na Região Metropolitana de Curitiba/PR. *Visão Acadêmica*, 11, 80-92. Obtido em 13 de fevereiro de 2017, de <http://revistas.ufpr.br/academica/article/viewFile/21372/14092>

Sobiologia. (sd). *Fermentação*. Obtido em 13 de fevereiro de 2017, de Libertação de Energia Atraves de Fermentação: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica3.php>

Sousa, G. S. (2016). *Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Obtido em 15 de fevereiro de 2017, de [file:///C:/Users/Sony/Downloads/SousaGizeleSaraivade\\_M%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Sony/Downloads/SousaGizeleSaraivade_M%20(1).pdf)

Sousa, J., & Monteiro, R. (2011). Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de Etanol. *Fazu*, 100-107. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de <http://www.fazu.br/ojs/index.php/fazuemrevista/article/viewFile/380/268>

Suman, P. A. (maio de 2012). *Processos de Obtenção de Vinagre de Gengibre*. Botucatu: Faculdade de Ciencias Agronomicas. Obtido em 14 de fevereiro de 2017, de <http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0795.pdf>

Tagusvalley. (2017). Obtido em 20 de outubro de 2017, de CENTRO DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA ALIMENTAR: <http://tagusvalley.pt/pt/servicos/inovlinea-transferencia-de-tecnologia-alimentar/>

Takemoto, S. Y. (20 de outubro de 2000). *Avaliação do Teor de Acetoína em Vinagres como Forma de Verificação de sua Genuinidade*. Florianopolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Obtido em 15 de fevereiro de 2017, de <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/78648/50035.pdf?sequence=1>

Tessaro, D., Larsen, A. C., Dallago, R. C., & Gomes, S. (2010). Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja. *Acta Scientiarum. Technology*, 32, 201-205.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. (nd de nd). *Produção de Vinagre*. Obtido em 13 de fevereiro de 2017, de <http://www.ebah.pt/content/ABAAAe9AYAE/vinagre>

Viana, T. M. (2009). *Caraterização Bioenergética de Saccharomyces Cerevisiae em Fermentação Vinária*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. Obtido em 21 de Outubro de 2017, de <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2013/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>

Zilioli, E. (21 de setembro de 2011). *Composição Química e Propriedades Funcionais no Processamento de Vinagres*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Obtido em 15 de fevereiro de 2017, de file:///C:/Users/Sony/Downloads/ZilioliEstevao\_D.pdf